



IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Renu Wadhwa et al.  
Serial No. : 10/045,815  
Filed : October 26, 2001  
Title : TUMOR SUPPRESSOR GENE

Art Unit : 1645  
Examiner : Unknown

Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

RECEIVED  
APR 25 2002  
TECH-CENTER 1600/2900

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 from Japanese Patent Application No. 11/118806, filed April 26, 1999. A certified copy of the application from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date:

April 16, 2002

Janis K. Fraser, Ph.D., J.D.  
Reg. No. 34,819

Fish & Richardson P.C.  
225 Franklin Street  
Boston, Massachusetts 02110-2804  
Telephone: (617) 542-5070  
Facsimile: (617) 542-8906

20415303.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

APRIL 16, 2002  
Date of Deposit  
Kathleen Philpot  
Signature  
KATHLEEN PHILPOT  
Typed or Printed Name of Person Signing Certificate



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 4月26日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第118806号

出 願 人

Applicant(s):

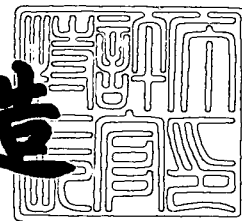
株式会社中外分子医学研究所

RECEIVED  
APR 25 2002  
TECH CENTER 1600/2900

2001年12月28日

特 許 庁 長 官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3112730

【書類名】 特許願

【整理番号】 C1-104

【提出日】 平成11年 4月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/12

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 レヌー ワダワ

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 杉原 崇

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県新治郡新治村永井 1 5 3 番地 2 株式会社中外分子医学研究所内

【氏名】 吉田 暁子

【特許出願人】

【識別番号】 596102791

【氏名又は名称】 株式会社中外分子医学研究所

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 腫瘍抑制遺伝子

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号：4 または 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：4 または 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 2】 配列番号：3 または 5 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、配列番号：4 または 6 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 3】 配列番号：2 または 8 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2 または 8 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 4】 配列番号：1 または 7 に記載の塩基配列からなる DNA とハイブリダイズする DNA がコードするタンパク質であって、配列番号：2 または 8 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質。

【請求項 5】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質をコードする DNA。

【請求項 6】 請求項 5 に記載の DNA が挿入されたベクター。

【請求項 7】 請求項 6 に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項 8】 請求項 7 に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質の製造方法。

【請求項 9】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質に対する抗体。

【請求項 10】 請求項 1 から 4 のいずれかに記載のタンパク質の部分ペプチド。

【請求項 1 1】 配列番号：1、3、5、または7に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA。

【請求項 1 2】 請求項 1 から4のいずれかに記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

- (a) 該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、
- (b) 該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、
- (c) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 3】 請求項 1 2に記載の方法により単離されうる、請求項 1 から4のいずれかに記載のタンパク質に結合する化合物。

【請求項 1 4】 請求項 1 から4のいずれかに記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法であって、

- (a) 被検試料の存在下で、該タンパク質を発現する細胞を培養する工程、
- (b) 該細胞の増殖を検出する工程、
- (c) 被検試料非存在下で検出した場合と比較して、該増殖を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 1 5】 請求項 1 4に記載の方法により単離されうる、請求項 1 から4のいずれかに記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、生物科学分野、詳しくは癌研究の分野に関する。特に、細胞の増殖機構に関与する新規なタンパク質に関する。本発明のタンパク質は、例えば、癌に対する医薬品開発の標的分子として利用しうる。

【0002】

【従来技術】

細胞遺伝学及び分子生物学的なアプローチにより多くの悪性腫瘍において、ヒト染色体1p上にランダムではない遺伝子変異があることが示唆されている (Car

on, H. (1995) *Med Pediatr Oncol* 24, 215-21; Schwab, M. et al (1996) *Genes Chromosomes Cancer* 16, 211-29)。例えば、染色体1p領域における欠失が様々な癌細胞において、見いだされている (neuroblastomas [White, P. S. et al (1997) *Eur J Cancer* 33, 1957-61, Gros16; Ariyama, T. et al (1995) *Genomics* 25, 114-23; Cheng, N. C. et al (1995) *Oncogene* 10, 291-7], meningiomas [Ishino, S. et al (1998) *Cancer* 83, 360-6], pheochromocytomas, medullary thyroid carcinomas, neuroendocrine tumors [Moley, J. F. et al (1992) *Cancer Res* 52, 770-4], T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) [Iolascon, A. et al (1997) *Leukemia* 11, 359-63], colorectal cancers [Praml, C. et al (1995) *Oncogene* 11, 1357-62, Gros13; Bomme, L. et al (1998) *Genes Chromosomes Cancer* 21, 185-94; Di Vinci, A. et al (1998) *Cancer* 83, 415-22], mesothelioma [Lee, W. C. et al (1996) *Cancer Res* 56, 4297-301], hepatoma [Chen, H. L. et al (1996) *Cancer Genet Cytogenet* 86, 102-6], endometrial carcinoma [Arlt, M. F. et al (1996) *Hum Mol Genet* 5, 1017-21], breast cancers [Nagai, H. et al (1995) *Cancer Res* 55, 1752-7; Munn, K. E. et al (1995) *Oncogene* 10, 1653-7] など)。また、1p領域の変異はリンパ節転移や腫瘍の大きさとも相関していると言われている [Borg, A. et al (1992) *Genes Chromosomes Cancer* 5, 311-20; Tsukamoto, K. et al (1998) *Cancer* 82, 317-22]。さらに、4歳以下の小児において発生する内胚葉性生殖腺洞腫瘍 (endodermal sinus tumors; CESTs)における遺伝的変異も染色体1p上にあることが示唆されている [Perlman, E. J. et al (1996) *Genes Chromosomes Cancer* 16, 15-20]。これらの事実から、染色体1pにおける一つまたは複数の遺伝子変異が悪性腫瘍に関係していることが考えられる。しかし、現在までのところその原因遺伝子は明らかになっていない。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、細胞の増殖機構に関与する新規なタンパク質および該タンパク質をコードする遺伝子、並びにそれらの製造および用途を提供することを課題とする。

## 【0004】

## 【課題を解決するための手段】

本発明者等は、不死化細胞（NIH3T3）の原形質膜のP100画分中のTriton X-100不溶画分に含まれる約30kDaのタンパク質（p33）に対する抗体を用いて、イムノスクリーニング法によりマウスRS-4細胞 cDNAライブラリーのスクリーニングを行った。これにより得られたcDNAをプローブとして、さらに、ヒト精巣ライブラリーのスクリーニングを行い、該ライブラリーから新規遺伝子Gros1をクローニングすることに成功した。ヒトGros1 cDNAは2種類（配列番号：1および3）存在し、それぞれ363アミノ酸のタンパク質（「ヒトGros1-Sタンパク質」と命名した。配列番号：2）、および736アミノ酸のタンパク質（「ヒトGros1-Lタンパク質」と命名した。配列番号：4）をコードしていた。

## 【0005】

さらに、上記イムノスクリーニング法により得られたcDNAをプローブとして、マウス精巣ライブラリーのスクリーニングおよびEST検索を行うことにより、マウスGros1-L cDNA（配列番号：5）およびマウスGros1-S cDNA（配列番号：7）を同定することに成功した。これらはそれぞれ747アミノ酸（配列番号：6）および542アミノ酸（配列番号：8）からなるタンパク質をコードしていた。

## 【0006】

ヒトおよびマウスGros1は、タンパク質データベース内に有意に一致するものが見いだせなかった。しかし、モチーフ検索によるアミノ酸配列の解析の結果、マウス、およびヒトのGros1-Lのアミノ酸配列は部分的に転写因子に多く見られるロイシンジッパー構造を有していた。

## 【0007】

ヒトGros1の染色体マッピングを行った結果、Gros1遺伝子は、多くの悪性腫瘍において、ランダムではない遺伝子変異があることが示唆されている（Caron, H. (1995) Med Pediatr Oncol 24, 215-21; Schwab, M. et al (1996) Genes Chromosomes Cancer 16, 211-29）、ヒト第1染色体短腕（1p）上に存在することが判明した。

## 【0008】

また、Gros1の組織、細胞、発生過程におけるmRNAの発現量をノーザンブロット法により検出した。その結果、ヒトでは4.4kbと2.5kbのバンドが、精巣、卵巣、胎盤においては非常に高い発現を示し、これら組織をのぞくほとんどの組織で弱く発現していた（図4）。ヒト培養細胞においては、上記組織より高いmRNAの発現を示し、ヒト正常培養細胞においては、2.5kb mRNAが4.4kbのmRNAの10倍近い発現量を示した（図5）。マウスにおいても3.5kbと2.5kbのバンドが、ほとんどの組織で弱く発現していたが、脳と脾臓では発現が見られず、精巣では2.5kbのみが発現していた。精巣及び卵巣においてはGros1遺伝子の二つの転写産物のうちの短いフォームのものしか検出されなかった。発生過程における発現は、発生過程11日目において劇的に発現が消失することが示された。（図6）。

【0009】

さらに、本発明者等はマウスの85kDaのタンパク質（Gros1-L；配列番号：6）をコードする該遺伝子をNIH3T3へ遺伝子導入することにより、Gros1の機能解析を進めた。その結果、対照やC末端を欠失したGros-1に比べ、全長Gros1-Lを発現する細胞では細胞増殖が抑制され、コロニー形成率が減少した。一方、Gros1-LのアンチセンスRNAを発現させた細胞では、コロニー形成率が5倍に上昇した。

【0010】

これらの事実から、Gros1タンパク質は、細胞増殖の制御に関与する新規遺伝子であり、腫瘍の発生や発達に関与していると考えられ、Gros1タンパク質は、腫瘍に対する医薬品開発のためのツールとして有用である。

【0011】

本発明は細胞増殖に関与する新規なタンパク質（Gros1）およびその遺伝子、並びにそれらの製造及び用途に関し、より具体的には、

（1） 配列番号：4または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：4または6に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

（2） 配列番号：3または5に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：4または6に記載のア

ミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(3) 配列番号：2または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質、または該タンパク質中のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列を有し、配列番号：2または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(4) 配列番号：1または7に記載の塩基配列からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、配列番号：2または8に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質、

(5) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質をコードするDNA、

(6) (5) に記載のDNAが挿入されたベクター、

(7) (6) に記載のベクターを保持する宿主細胞、

(8) (7) に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、(1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質の製造方法、

(9) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質に対する抗体、

(10) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質の部分ペプチド、

(11) 配列番号：1、3、5、または7に記載の塩基配列からなるDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNA、

(12) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 該タンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、

(b) 該タンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、

(c) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する活性を有する化合物を選択する工程、を含む方法、

(13) (12) に記載の方法により単離されうる、(1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質に結合する化合物、

(14) (1) から (4) のいずれかに記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物のスクリーニング方法であって、

(a) 被検試料の存在下で、該タンパク質を発現する細胞を培養する工程、

(b) 該細胞の増殖を検出する工程、

(c) 被検試料非存在下で検出した場合と比較して、該増殖を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む方法、

(15) (14)に記載の方法により単離されうる、(1)から(4)のいずれかに記載のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物、に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明は、細胞増殖機構に関与する新規なタンパク質 Gros1 に関する。本発明者らにより単離された2種のヒト Gros1 (ヒト Gros1-Sおよびヒト Gros1-L) のcDNAの塩基配列を配列番号：1および3に、該cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：2および4に示す。また、本発明者らにより単離されたマウスGros1 (マウス Gros1-LおよびマウスGros1-S) の2種のcDNAの塩基配列を配列番号：5および7に、該cDNAによりコードされるタンパク質のアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：6および8に示す。

【0013】

Gros1-Lタンパク質をNIH-3T3細胞において外来的に発現させると、その細胞増殖が抑制され、コロニー形成率が低下する。反対に、NIH-3T3細胞において、Gros1アンチセンスcDNAの導入により、Gros1-Lタンパク質の発現を抑制すると、コロニー形成率は顕著に上昇する。このため、Gros1タンパク質は細胞増殖の制御に関与していると考えられる。このことは、ヒトGros1遺伝子が、悪性腫瘍に関与しているとされる第1染色体短腕(1p)上に存在するという事実からも裏付けられる。従って、本発明のGros1タンパク質は、細胞増殖を制御する因子の精製やクローニングのためのツールとして、また細胞増殖が関与する腫瘍などの疾患の治療薬や予防薬の候補化合物のスクリーニングなどの標的として好適に利用しうる。また、Gros1遺伝子には、各種腫瘍などにおける遺伝子治療などの治療への応用が考えられる。

【0014】

本発明は、Gros1タンパク質と機能的に同等なタンパク質を包含する。このよ

うなタンパク質には、例えば、ヒトまたはマウスGros1タンパク質に対応する他の生物のホモログタンパク質やヒトまたはマウスGros1タンパク質の変異体が含まれる。

## 【0015】

本発明において「機能的に同等」とは、Gros1タンパク質と同様に、対象となるタンパク質が細胞増殖を抑制する活性を有することを指す。対象となるタンパク質が細胞増殖活性を有するか否かは、対象となるタンパク質をコードするDNAを、NIH-3T3細胞などの細胞に導入し、これを発現させ、該細胞の増殖の抑制やコロニー形成率の低下を検出することにより判定することができる。

## 【0016】

あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法 (Hashimoto-Gotoh, T. et al. (1995) Gene 152, 271-275, Zoller, MJ, and Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500, Kramer, W. et al. (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456, Kramer W, and Fritz HJ (1987) Methods. Enzymol. 154, 350-367, Kunkel, TA (1985) Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492, Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763-2766) などを用いて、ヒトまたはマウスGros1タンパク質のアミノ酸に適宜変異を導入することによりヒトまたはマウスGros1タンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製することができる。また、アミノ酸の変異は自然界においても生じうる。このように、ヒトまたはマウスGros1タンパク質のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が変異したアミノ酸配列を有し、ヒトまたはマウスGros1タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このような変異体における、変異するアミノ酸数は、通常、10アミノ酸以内であり、好ましくは、6アミノ酸以内であり、さらに好ましくは3アミノ酸以内であると考えられる。

## 【0017】

あるアミノ酸配列に対する1又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質が

その生物学的活性を維持することはすでに知られている (Mark, D. F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1984) 81, 5662-5666、Zoller, M. J. & Smith, M. Nucleic Acids Research (1982) 10, 6487-6500、Wang, A. et al., Science 224, 1431-1433、Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982) 79, 6409-6413)。

## 【0018】

また、変異するアミノ酸残基においては、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸 (A, I, L, M, F, P, W, Y, V)、親水性アミノ酸 (R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、脂肪族側鎖を有するアミノ酸 (G, A, V, L, I, P)、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸 (S, T, Y)、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸 (C, M)、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸 (D, N, E, Q)、塩基含有側鎖を有するアミノ酸 (R, K, H)、芳香族含有側鎖を有するアミノ酸 (H, F, Y, W) を挙げることができる (括弧内はいずれもアミノ酸の一字標記を表す)。

## 【0019】

ヒトまたはマウスGros1タンパク質のアミノ酸配列 (配列番号: 2、4、6、または8) に1又は複数個のアミノ酸残基が付加されたタンパク質としては、例えば、ヒトまたはマウスGros1タンパク質を含む融合タンパク質が挙げられる。融合タンパク質は、ヒトまたはマウスGros1タンパク質と他のペプチド又はタンパク質とが融合したものであり、本発明に含まれる。融合タンパク質を作製する方法は、本発明のヒトまたはマウスGros1タンパク質をコードするDNAと他のペプチド又はタンパク質をコードするDNAをフレームが一致するように連結してこれを発現ベクターに導入し、宿主で発現させればよく、当業者に公知の手法を用いることができる。本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチド又はタンパク質としては、特に限定されない。

## 【0020】

本発明のタンパク質との融合に付される他のペプチドとしては、例えば、FLAG (Hopp, T. P. et al., BioTechnology (1988) 6, 1204-1210)、6個のHis (

ヒスチジン) 残基からなる6×His、10×His、インフルエンザ凝集素 (HA)、ヒトc-myc の断片、VSV-GPの断片、p18HIVの断片、T7-tag、HSV-tag、E-tag、SV 40T 抗原の断片、lck tag、 $\alpha$ -tubulinの断片、B-tag、Protein C の断片等の公知のペプチドを使用することができる。また、本発明のタンパク質との融合に付される他のタンパク質としては、例えば、GST (グルタチオン-S-トランスフェラーゼ)、HA (インフルエンザ凝集素)、イムノグロブリン定常領域、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、MBP (マルトース結合タンパク質) 等が挙げられる。

## 【0021】

市販されているこれらペプチドまたはタンパク質をコードするDNAを本発明のタンパク質をコードするDNAと融合させ、これにより調製された融合DNAを発現させることにより、融合タンパク質を調製することができる。

## 【0022】

また、あるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を調製する当業者によく知られた他の方法としては、ハイブリダイゼーション技術 (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58, Cold Spring Harbor Lab. press, 1989) を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ヒトまたはマウスGros1タンパク質をコードするDNA配列 (配列番号: 1、3、5、または7) もしくはその一部を基に、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAからヒトまたはマウスGros1タンパク質と機能的に同等なタンパク質を単離することも通常行いうることである。このように、ヒトまたはマウスGros1タンパク質をコードするDNAもしくはその一部からなるDNAとハイブリダイズするDNAがコードするタンパク質であって、ヒトまたはマウスGros1タンパク質と機能的に同等なタンパク質もまた本発明のタンパク質に含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、ヒトやマウス以外の哺乳動物のホモログ (例えば、サル、ラット、ウサギ、ウシの遺伝子がコードするタンパク質) が挙げられる。ヒトまたはマウスGros1タンパク質をコードするDNAと相同性の高いcDNAを、動物から単離する場合、特に卵巣や精巣の組織を用いることが好ましいと考えられる。

## 【0023】

ヒトまたはマウスGros1タンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするD

NAを単離するためのハイブリダイゼーションの条件としては、当業者であれば適宜選択することができる。一例を示せば、「Rapid-hyb buffer」(Amersham LIFE SCIENCE社製)を用い、68℃で30分以上プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68℃で1時間以上保温することによりハイブリダイゼーションを行う。その後の洗浄は、例えば低ストリンジェントな条件で行うことができる。低ストリンジェントの条件とは、例えば42℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられ、好ましくは50℃、2×SSC、0.1% SDSである。またより好ましくは、高ストリンジェントな条件が挙げられる。高ストリンジェントな条件とは、例えば2XSSC、0.01% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1 × SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、次いで、1 × SSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行う。但し、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

## 【0024】

また、ハイブリダイゼーションにかえて、ヒトまたはマウスGros1タンパク質をコードするDNA(配列番号: 1、3、5、または7)の配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法を利用して単離することも可能である。

## 【0025】

これらハイブリダイゼーション技術または遺伝子増幅技術により単離されるDNAがコードするヒトまたはマウスGros1タンパク質と機能的に同等なタンパク質は、通常、ヒトまたはマウスGros1タンパク質とアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、通常、40%以上の相同性、好ましくは60%以上の相同性、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは95%以上の同一性を指す。タンパク質の相同性を決定するには、文献(Wilbur, W. J. and Lipman, D. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80, 726-730)に記載のアルゴリズムにしたがえばよい。

## 【0026】

本発明のタンパク質は、後述するそれを産生する細胞や宿主あるいは精製方法により、アミノ酸配列、分子量、等電点又は糖鎖の有無や形態などが異なり得る。しかしながら、得られたタンパク質が、本発明のヒトまたはマウスGros1タンパク質（配列番号：2，4，6または8）と同等の機能を有している限り、本発明に含まれる。

## 【0027】

本発明のタンパク質は、当業者に公知の方法により、組み換えタンパク質として、また天然のタンパク質として調製することが可能である。組み換えタンパク質であれば、本発明のタンパク質をコードするDNA（例えば配列番号：1，3，5，または7に記載の塩基配列を有するDNA）を、適当な発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して得た形質転換体を回収し、抽出物を得た後、イオン交換、逆相、ゲル濾過などのクロマトグラフィー、あるいは本発明のタンパク質に対する抗体をカラムに固定したアフィニティークロマトグラフィーにけることにより、または、さらにこれらのカラムを複数組み合わせることにより精製し、調製することが可能である。

## 【0028】

また、本発明のタンパク質をグルタチオンSトランスフェラーゼタンパク質との融合タンパク質として、あるいはヒスチジンを複数付加させた組み換えタンパク質として宿主細胞（例えば、動物細胞や大腸菌など）内で発現させた場合には、発現させた組み換えタンパク質はグルタチオンカラムあるいはニッケルカラムを用いて精製することができる。

## 【0029】

融合タンパク質の精製後、必要に応じて融合タンパク質のうち目的のタンパク質以外の領域を、トロンビンまたはファクターXaなどにより切断し、除去することも可能である。

## 【0030】

天然のタンパク質であれば、当業者に周知の方法、例えば、本発明のタンパク質を発現している組織や細胞の抽出物に対し、後述するGros1タンパク質に結合する抗体が結合したアフィニティークラムを作用させて精製することにより単離

することができる。抗体はポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。

#### 【0031】

本発明は、また、本発明のタンパク質の部分ペプチドを包含する。本発明のタンパク質に特異的なアミノ酸配列からなる部分ペプチドは、少なくとも7アミノ酸、好ましくは8アミノ酸以上、さらに好ましくは9アミノ酸以上のアミノ酸配列からなる。該部分ペプチドは、例えば、本発明のタンパク質に対する抗体の作製、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニングや、本発明のタンパク質の促進剤や阻害剤のスクリーニングに利用し得る。

#### 【0032】

本発明の部分ペプチドは、遺伝子工学的手法、公知のペプチド合成法、あるいは本発明のタンパク質を適切なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。ペプチド合成法としては、たとえば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。

#### 【0033】

また、本発明は、本発明のタンパク質をコードするDNAに関する。本発明のDNAは、上述したような本発明のタンパク質の *in vivo* や *in vitro* における生産に利用される他、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子の異常に起因する疾患の遺伝子治療などへの応用も考えられる。本発明のDNAは、本発明のタンパク質をコードしうるものであれば、いかなる形態でもよい。即ち、mRNAから合成されたcDNAであるか、ゲノムDNAであるか、化学合成DNAであるかなどを問わない。また、本発明のタンパク質をコードしうる限り、遺伝暗号の縮重に基づく任意の塩基配列を有するDNAが含まれる。

#### 【0034】

本発明のDNAは、当業者に公知の方法により調製することができる。例えば、本発明のタンパク質を発現している細胞よりcDNAライブラリーを作製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1、3、5、または7）の一部をプローブにしてハイブリダイゼーションを行うことにより調製できる。cDNAライブラリーは、例えばSambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Labor

atory Press (1989)に記載の方法により調製してもよいし、市販の DNAライブラリーを用いてもよい。また、本発明のタンパク質を発現している細胞よりRNAを調製し、本発明のDNAの配列（例えば、配列番号：1、3、5、または7）に基づいてオリゴDNAを合成し、これをプライマーとして用いてPCR反応を行い、本発明のタンパク質をコードするcDNAを増幅させることにより調製することも可能である。

## 【0035】

また、得られたcDNAの塩基配列を決定することにより、それがコードする翻訳領域を決定でき、本発明のタンパク質のアミノ酸配列を得ることができる。また、得られたcDNAをプローブとしてゲノムDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、ゲノムDNAを単離することができる。

## 【0036】

具体的には、次のようにすればよい。まず、本発明のタンパク質を発現する細胞、組織、臓器（例えば卵巣、精巣、胎盤など）から、mRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法(Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法 (Chomczynski, P. and Sacchi, N., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159) 等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia) 等を使用して全RNAからmRNAを精製する。また、Quic kPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia) を用いることによりmRNAを直接調製することもできる。

## 【0037】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit (生化学工業) 等を用いて行うこともできる。また、本明細書に記載されたプライマー等を用いて、5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製) およびポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction ; PCR) を用いた5'-RACE法(Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 8998-9002 ; Belyavsky, A. et al., *Nucl eic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932) にしたがって、cDNAの合成および増幅を行うことができる。

【 0 0 3 8 】

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を調製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列は、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法により確認することができる。

【 0 0 3 9 】

また、本発明のDNAにおいては、発現に使用する宿主のコドン使用頻度を考慮して、より発現効率の高い塩基配列を設計することができる (Grantham, R. et al., Nucleic Acids Research (1981) 9, p43-p74)。また、本発明のDNAは、市販のキットや公知の方法によって改変することができる。改変としては、例えば、制限酵素による消化、合成オリゴヌクレオチドや適当なDNAフラグメントの挿入、リンカーの付加、開始コドン (ATG) 及び／又は終止コドン (TAA, TGA, 又はTAG) の挿入等が挙げられる。

【 0 0 4 0 】

本発明のDNAは、具体的には、配列番号：1の塩基配列において52位の塩基Aから1140位の塩基CからなるDNA、配列番号：3の塩基配列において52位の塩基Aから2259位の塩基AからなるDNA、配列番号：5の塩基配列において12位の塩基Aから2252位の塩基GからなるDNA、および配列番号：7の塩基配列において12位の塩基Aから1640位の塩基AからなるDNA、を包含する。

【 0 0 4 1 】

本発明のDNAはまた、配列番号：1、3、5、または7に示す塩基配列からなるDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAであり、且つ上記本発明のタンパク質と機能的に同等なタンパク質をコードするDNAを含む。

【 0 0 4 2 】

ストリンジントな条件としては、当業者であれば適宜選択することができるが、例えば低ストリンジントな条件が挙げられる。またより好ましくは、高ストリンジントな条件が挙げられる。これらの条件は、前記の通りである。上記のハイブリダイズするDNAは、好ましくはcDNAまたは染色体DNAである。

【0043】

また、本発明は、本発明のDNAが挿入されたベクターに関する。本発明のベクターとしては、宿主細胞内において本発明のDNAを保持したり、本発明のタンパク質を発現させるために有用である。

【0044】

ベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合には、ベクターを大腸菌（例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1Blue）などで大量に増幅させ大量調製するために、大腸菌で増幅されるための「ori」をもち、さらに形質転換された大腸菌の選抜遺伝子（例えば、なんらかの薬剤（アンピシリンやテトラサイクリン、カナマイシン、クロラムフェニコール）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すれば特に制限はない。ベクターの例としては、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、pCR-Scriptなどが挙げられる。また、cDNAのサブクローニング、切り出しを目的とした場合、上記ベクターの他に、例えば、pGEM-T、pDIRECT、pT7などが挙げられる。本発明のタンパク質を生産する目的においてベクターを使用する場合には、特に、発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、例えば、大腸菌での発現を目的とした場合は、ベクターが大腸菌で増幅されるような上記特徴を持つほかに、宿主をJM109、DH5 $\alpha$ 、HB101、XL1Blueなどの大腸菌とした場合においては、大腸菌で効率よく発現できるようなプロモーター、例えば、lacZプロモーター（Wardら、Nature (1989) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araBプロモーター（Betterら、Science (1988) 240, 1041-1043）、またはT7プロモーターなどを持っていることが不可欠である。このようなベクターとしては、上記ベクターの他にpGEX-5X-1（Pharmacia社製）、「QIAexpress system」（Qiagen社製）、pEGFP、またはpET（この場合、宿主はT7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21が好ましい）などが挙げられる。

【0045】

また、ベクターには、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列が含まれていてもよい。タンパク質分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列（Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987

) 169, 4379 ) を使用すればよい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法を用いて行うことができる。

【 0 0 4 6 】

大腸菌以外にも、例えば、本発明のタンパク質を製造するために、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3 (Invitrogen社製) や、pEGF-BOS (Nucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322)、pEF、pCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば「Bac-to-BAC baculovirus expression system」(GIBCO BRL社製)、pBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えばpMH1、pMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、pAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZipneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」(Invitrogen社製)、pNV11、SP-Q01)、枯草菌由来の発現ベクター（例えば、pPL608、pKTH50）が挙げられる。

【 0 0 4 7 】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞等の動物細胞での発現を目的とした場合には、細胞内で発現させるために必要なプロモーター、例えばSV40プロモーター (Mulliganら, Nature (1979) 277, 108)、MLLV-LTRプロモーター、EF1 $\alpha$ プロモーター (Mizushimaら, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)、CMVプロモーターなどを持っていることが不可欠であり、細胞への形質転換を選抜するための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）により判別できるような薬剤耐性遺伝子）を有すればさらに好ましい。このような特性を有するベクターとしては、例えば、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、pOP13などが挙げられる。

【 0 0 4 8 】

さらに、遺伝子を安定的に発現させ、かつ、細胞内での遺伝子のコピー数の増幅を目的とする場合には、核酸合成経路を欠損したCHO細胞にそれを相補するDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHOIなど）を導入し、メトトレキセート (MTX) により増幅させる方法が挙げられ、また、遺伝子の一過性の発現を目的とする場合には、SV40 T抗原を発現する遺伝子を染色体上に持つCOS細胞を用いてSV40の複製機転を持つベクター (pcDなど) で形質転換する方法が挙げられる。

【 0 0 4 9 】

一方、動物の生体内で本発明のDNAを発現させる方法としては、本発明のDNAを適当なベクターに組み込み、レトロウイルス法、リポソーム法、カチオニックリポソーム法、アデノウイルス法などにより生体内に導入する方法などが挙げられる。これにより、本発明のGros1遺伝子の変異に起因する疾患に対する遺伝子治療を行うことが可能である。用いられるベクターとしては、例えば、アデノウイルスベクター（例えばpAdexlcw）やレトロウイルスベクター（例えばpZIPneo）などが挙げられるが、これらに制限されない。ベクターへの本発明のDNAの挿入などの一般的な遺伝子操作は、常法に従って行うことが可能である（Molecular Cloning, 5.61-5.63）。生体内への投与は、ex vivo法であっても、in vivo法であってもよい。

## 【0050】

また、本発明は、本発明のベクターが導入された宿主細胞に関する。本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、例えば、大腸菌や種々の動物細胞などを用いることが可能である。本発明の宿主細胞は、例えば、本発明のタンパク質の製造や発現のための産生系として使用することができる。タンパク質製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

## 【0051】

真核細胞を使用する場合、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を宿主に用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞、例えば、CHO（J. Exp. Med. (1995) 108, 945）、COS、3T3、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、HeLa、Vero、両生類細胞、例えばアフリカツメガエル卵母細胞（Valle, et al., Nature (1981) 291, 358-340）、あるいは昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5が知られている。CHO細胞としては、特に、DHFR遺伝子を欠損したCHO細胞であるdhfr-CHO（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220）やCHO K-1（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1968) 60, 1275）を好適に使用することができる。動物細胞において、大量発現を目的とする場合には特にCHO細胞が好ましい。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキ

ストラン法、カチオニックリボソームDOTAP（ベーリンガーマンハイム社製）を用いた方法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法で行うことが可能である。

## 【0052】

植物細胞としては、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) 由来の細胞がタンパク質生産系として知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、例えば、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) が知られている。

## 【0053】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、例えば、JM109、DH5 $\alpha$ 、HB101 等が挙げられ、その他、枯草菌が知られている。

## 【0054】

これらの細胞を目的とするDNAにより形質転換し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することによりタンパク質が得られる。培養は、公知の方法に従い行うことができる。例えば、動物細胞の培養液として、例えば、DMEM、MEM、RPMI 1640、IMDMを使用することができる。その際、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできるし、無血清培養してもよい。培養時のpHは、約6~8であるのが好ましい。培養は、通常、約30~40℃で約15~200時間行い、必要に応じて培地の交換、通気、攪拌を加える。

## 【0055】

一方、*in vivo* でタンパク質を産生させる系としては、例えば、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。これらの動物又は植物に目的とするDNAを導入し、動物又は植物の体内でタンパク質を産生させ、回収する。本発明における「宿主」とは、これらの動物、植物を包含する。

## 【0056】

動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。哺乳類動物と

しては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシを用いることができる (Vicki Glas er, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、哺乳類動物を用いる場合、トランスジェニック動物を用いることができる。

## 【0057】

例えば、目的とするDNAを、ヤギ $\beta$ カゼインのような乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子との融合遺伝子として調製する。次いで、この融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ移植する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から、目的のタンパク質を得ることができる。トランスジェニックヤギから産生されるタンパク質を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

## 【0058】

また、昆虫としては、例えばカイコを用いることができる。カイコを用いる場合、目的のタンパク質をコードするDNAを挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させることにより、このカイコの体液から目的のタンパク質を得ることができる (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。

## 【0059】

さらに、植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。タバコを用いる場合、目的とするタンパク質をコードするDNAを植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば、ニコチアナ・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望のポリペプチドを得ることができる (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

## 【0060】

これにより得られた本発明のタンパク質は、宿主細胞内または細胞外 (培地など) から単離し、実質的に純粋で均一なタンパク質として精製することができる。タンパク質の分離、精製は、通常のタンパク質の精製で使用されている分離、

精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、溶媒沈殿、溶媒抽出、蒸留、免疫沈降、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動法、透析、再結晶等を適宜選択、組み合わせればタンパク質を分離、精製することができる。

## 【0061】

クロマトグラフィーとしては、例えばアフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996)。これらのクロマトグラフィーは、液相クロマトグラフィー、例えばHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。本発明は、これらの精製方法を用い、高度に精製されたタンパク質も包含する。

## 【0062】

なお、タンパク質を精製前又は精製後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させることにより、任意に修飾を加えたり部分的にペプチドを除去することもできる。タンパク質修飾酵素としては、例えば、トリプシン、キモトリプシン、リシルエンドペプチダーゼ、プロテインキナーゼ、グルコシダーゼなどが用いられる。

## 【0063】

また、本発明は、本発明のタンパク質と結合する抗体に関する。本発明の抗体の形態には、特に制限はなく、ポリクローナル抗体の他、モノクローナル抗体も含まれる。また、ウサギなどの免疫動物に本発明のタンパク質を免疫して得た抗血清、すべてのクラスのポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体、さらにヒト抗体や遺伝子組み換えによるヒト型化抗体も含まれる。

## 【0064】

抗体取得の感作抗原として使用される本発明のタンパク質は、その由来となる動物種に制限されないが哺乳動物、例えばヒト、マウス又はラット由来のタンパク質が好ましく、特にヒト由来のタンパク質が好ましい。ヒト由来のタンパク質は、本明細書に開示される遺伝子配列又はアミノ酸配列を用いて得ることができ

る。

【0065】

本発明において、感作抗原として使用されるタンパク質は、完全なタンパク質であってもよいし、また、タンパク質の部分ペプチドであってもよい。タンパク質の部分ペプチドとしては、例えば、タンパク質のアミノ基（N）末端断片やカルボキシ（C）末端断片が挙げられる。本明細書で述べる「抗体」とはタンパク質の全長又は断片に反応する抗体を意味する。

【0066】

本発明のタンパク質又はその断片をコードする遺伝子を公知の発現ベクター系に挿入し、該ベクターで本明細書で述べた宿主細胞を形質転換させ、該宿主細胞内外から目的のタンパク質又はその断片を公知の方法で得て、これら有感作抗原として用いればよい。また、タンパク質を発現する細胞又はその溶解物あるいは化学的に合成した本発明のタンパク質有感作抗原として使用してもよい。

【0067】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的には、げっ歯目、ウサギ目、霊長目の動物が使用される。

【0068】

げっ歯目の動物としては、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。ウサギ目の動物としては、例えば、ウサギが使用される。霊長目の動物としては、例えば、サルが使用される。サルとしては、狭鼻下目のサル（旧世界ザル）、例えば、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー等が使用される。

【0069】

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。一般的方法としては、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は皮下に注射する。具体的には、感作抗原をPBS（Phosphate-Buffered Saline）や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものに対し、所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に投与する。さらに、その後、フロ

イント不完全アジュバントに適量混合した感作抗原を、4~21日毎に数回投与することが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを常法により確認する。

## 【0070】

ここで、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体を得るには、血清中の所望の抗体レベルが上昇したことを確認した後、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出す。この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用してもよいし、必要に応じこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離して、これを使用してもよい。例えば、本発明のタンパク質をカップリングさせたアフィニティーカラムを用いて、本発明のタンパク質のみを認識する画分を得て、さらにこの画分をプロテインAあるいはプロテインGカラムを利用して精製することにより、免疫グロブリンGあるいはMを調製することができる。

## 【0071】

モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物の血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後、哺乳動物から免疫細胞を取り出し、細胞融合に付せばよい。この際、細胞融合に使用される好ましい免疫細胞として、特に脾細胞が挙げられる。前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としては、好ましくは哺乳動物のミエローマ細胞、より好ましくは、薬剤による融合細胞選別のための特性を獲得したミエローマ細胞が挙げられる。

## 【0072】

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、例えば、ミルステインらの方法(Galfre, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

## 【0073】

細胞融合により得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリド

ーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、通常、数日～数週間継続して行う。次いで、通常の限界希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングを行う。

【0074】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球、例えばEBウイルスに感染したヒトリンパ球を *in vitro* でタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物で感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を有するミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、タンパク質への結合活性を有する所望のヒト抗体を産生するハイブリドーマを得ることもできる（特開昭63-17688号公報）。

【0075】

次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のタンパク質をカップリングしたアフィニティーカラムなどにより精製することで調製することが可能である。本発明の抗体は、本発明のタンパク質の精製、検出に用いられる他、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。また、この抗体を本発明のタンパク質が関与する疾患の抗体治療へ応用することも考えられる。得られた抗体を人体に投与する目的（抗体治療）で使用する場合には、免疫原性を低下させるため、ヒト抗体やヒト型抗体が好ましい。

【0076】

例えば、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるタンパク質、タンパク質発現細胞又はその溶解物を免疫して抗体産生細胞を取得し、これをミエローマ細胞と融合させたハイブリドーマを用いてタンパク質に対するヒト抗体を取得することができる（国際公開番号W092-03918、W093-2227、W094-02602、W094-25585、W096-33735およびW096-34096参照）。

【0077】

ハイブリドーマを用いて抗体を産生する以外に、抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞を癌遺伝子（*oncogene*）により不死化させた細胞を用いてもよい。

## 【0078】

このように得られたモノクローナル抗体はまた、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体として得ることができる（例えば、Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照）。組換え型抗体は、それをコードするDNAをハイブリドーマ又は抗体を産生する感作リンパ球等の免疫細胞からクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させる。本発明は、この組換え型抗体を包含する。

## 【0079】

さらに、本発明の抗体は、本発明のタンパク質に結合する限り、その抗体断片や抗体修飾物であってよい。例えば、抗体断片としては、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv(scFv) (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496 ; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515 ; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663 ; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669 ; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137参照）。

## 【0080】

抗体修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明の「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野において既に確立されている。

## 【0081】

また、本発明の抗体は、公知の技術を使用して非ヒト抗体由来の可変領域とヒト抗体由来の定常領域からなるキメラ抗体又は非ヒト抗体由来のCDR（相補性決定領域）とヒト抗体由来のFR（フレームワーク領域）及び定常領域からなるヒト型化抗体として得ることができる。

【0082】

前記のように得られた抗体は、均一にまで精製することができる。本発明で用いられる抗体の分離、精製は通常のタンパク質で使われている分離、精製方法を使用すればよい。例えば、アフィニティークロマトグラフィー等のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等を適宜選択、組み合わせれば、抗体を分離、精製することができる (Antibodies : A Laboratory Manual, Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988) が、これらに限定されるものではない。。

【0083】

アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラムとして、Hyper D, POROS, Sepharose F. F. (Pharmacia) 等が挙げられる。

【0084】

アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー等が挙げられる (Strategies for Protein Purification and Characterization : A Laboratory Course Manual, Ed Daniel R. Marshak et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996) 。これらのクロマトグラフィーはHPLC、FPLC等の液相クロマトグラフィーを用いて行うことができる。

【0085】

また、本発明の抗体の抗原結合活性を測定する方法として、例えば、吸光度の測定、酵素結合免疫吸着検定法 (Enzyme-linked immunosorbent assay ; ELISA)

、EIA（酵素免疫測定法）、RIA（放射免疫測定法）あるいは蛍光抗体法を用いることができる。ELISAを用いる場合、本発明の抗体を固相化したプレートに本発明のタンパク質を添加し、次いで目的の抗体を含む試料、例えば、抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。酵素、例えば、アルカリフォスファターゼ等で標識した抗体を認識する二次抗体を添加し、プレートをインキュベーションし、次いで洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。タンパク質としてタンパク質の断片、例えばそのC末端からなる断片あるいはN末端からなる断片を使用してもよい。本発明の抗体の活性評価には、BIAcore(Pharmacia製)を使用することができる。

## 【0086】

これらの手法を用いることにより、本発明の抗体と試料中に含まれる本発明のタンパク質が含まれると予想される試料とを接触せしめ、該抗体と該タンパク質との免疫複合体を検出又は測定することからなる、本発明のタンパク質の検出又は測定方法を実施することができる。

## 【0087】

本発明のタンパク質の検出又は測定方法は、タンパク質を特異的に検出又は測定することができるため、タンパク質を用いた種々の実験等に有用である。

## 【0088】

本発明はまた、ヒトまたはマウスGros1タンパク質をコードするDNA（配列番号：1、3、5、または7）または該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし、少なくとも15塩基の鎖長を有するDNAに関する。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、他のタンパク質をコードするDNAとのクロスハイブリダイゼーションが有意に生じないことを意味する。このようなDNAには、本発明のタンパク質をコードするDNA又は該DNAと相補的なDNAと特異的にハイブリダイズし得るプローブやプライマー、ヌクレオチド又はヌクレオチド誘導体（例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドやリボザイム等）が含まれる。また、このようなDNAをDNAチップの作製に利用することもできる。

## 【0089】

本発明は、例えば、配列番号：1、3、5、または7のいずれか一つに示される塩基配列中のいずれかの箇所にハイブリダイズするアンチセンスオリゴヌクレオチドを含む。このアンチセンスオリゴヌクレオチドは、好ましくは配列番号：1、3、5、または7のいずれか一つに示される塩基配列中の連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドに対するアンチセンスオリゴヌクレオチドである。さらに好ましくは、前記連続する少なくとも15個以上のヌクレオチドが翻訳開始コドンを含む、前記のアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

## 【0090】

アンチセンスオリゴヌクレオチドとしては、それらの誘導体や修飾体を使用することができる。このような修飾体として、例えばメチルホスホネート型又はエチルホスホネート型のような低級アルキルホスホネート修飾体、ホスホロチオエート修飾体又はホスホロアミデート修飾体等が挙げられる。

## 【0091】

ここでいう「アンチセンスオリゴヌクレオチド」とは、DNA又はmRNAの所定の領域を構成するヌクレオチドに対応するヌクレオチドが全て相補的であるもののみならず、DNA またはmRNAとオリゴヌクレオチドとが配列番号：1、3、5、または7に示される塩基配列に特異的にハイブリダイズできる限り、1又は複数個のヌクレオチドのミスマッチが存在していてもよい。

## 【0092】

このようなDNAは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド配列領域で、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有する。なお、相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなDNAは、後述の実施例に記載するように本発明のタンパク質をコードするDNAを検出若しくは単離するためのプローブとして、又は増幅するためのプライマーとして有用である。

## 【0093】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、本発明のタンパク質の産

生細胞に作用して、該タンパク質をコードするDNA 又はmRNAに結合することにより、その転写又は翻訳を阻害したり、mRNA の分解を促進したりして、本発明のタンパク質の発現を抑制することにより、結果的に本発明のタンパク質の作用を抑制する効果を有する。

## 【0094】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は、それらに対して不活性な適当な基剤と混和して塗布剤、パップ剤等の外用剤とすることができる。

## 【0095】

また、必要に応じて、賦形剤、等張化剤、溶解補助剤、安定化剤、防腐剤、無痛化剤等を加えて錠剤、散財、顆粒剤、カプセル剤、リポソームカプセル剤、注射剤、液剤、点鼻剤など、さらに凍結乾燥剤とすることができる。これらは常法にしたがって調製することができる。

## 【0096】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体は患者の患部に直接適用するか、又は血管内に投与するなどして結果的に患部に到達し得るように患者に適用する。さらには、持続性、膜透過性を高めるアンチセンス封入素材を用いることもできる。例えば、リポソーム、ポリ-L- リジン、リピッド、コレステロール、リポフェクチン又はこれらの誘導体が挙げられる。

## 【0097】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド誘導体の投与量は、患者の状態に応じて適宜調整し、好ましい量を用いることができる。例えば、0.1 ~100mg/kg、好ましくは0.1 ~50mg/kg の範囲で投与することができる。

## 【0098】

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは本発明のタンパク質の発現を阻害し、従って本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することにおいて有用である。また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを含有する発現阻害剤は、本発明のタンパク質の生物学的活性を抑制することが可能である点で有用である。

## 【0099】

また、本発明は、本発明のタンパク質を利用する、本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニング方法に関する。このスクリーニング方法は、(a) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被検試料を接触させる工程、(b) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドと被検試料との結合活性を検出する工程、(c) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに結合する化合物を選択する工程、を含む。

## 【0100】

スクリーニングに用いられる本発明のタンパク質は組換えタンパク質であっても、天然由来のタンパク質であってもよい。また部分ペプチドであってもよい。被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。被検試料を接触させる本発明のタンパク質は、例えば、精製したタンパク質として、可溶型タンパク質として、担体に結合させた形態として、また、他のタンパク質との融合タンパク質として、被検試料に接触させることができる。

## 【0101】

本発明のタンパク質を用いて、例えば該タンパク質に結合するタンパク質をスクリーニングする方法としては、当業者に公知の多くの方法を用いることが可能である。このようなスクリーニングは、例えば、免疫沈降法により行うことができる。具体的には、以下のように行うことができる。本発明のタンパク質をコードする遺伝子を、pSV2neo, pcDNA 1, pCD8 などの外来遺伝子発現用のベクターに挿入することで動物細胞などで当該遺伝子を発現させる。発現に用いるプロモーターとしては SV40 early promoter (Rigby In Williamson (ed.), Genetic Engineering, Vol.3. Academic Press, London, p.83-141(1982)), EF-1  $\alpha$  promoter (Kimら Gene 91, p.217-223 (1990)), CAG promoter (Niwa et al. Gene 108, p.193-200 (1991)), RSV LTR promoter (Cullen Methods in Enzymology 152, p.684-704 (1987)), SR  $\alpha$  promoter (Takebe et al. Mol. Cell. Biol. 8, p.466 (1988)), CMV immediate early promoter (Seed and Aruffo Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, p.3365-3369 (1987)), SV40 late promoter (Gheysen and

Fiers J. Mol. Appl. Genet. 1, p.385-394 (1982)), Adenovirus late promoter (Kaufman et al. Mol. Cell. Biol. 9, p. 946 (1989)), HSV TK promoter 等の一般的に使用できるプロモーターであれば何を用いてもよい。動物細胞に遺伝子を導入することで外来遺伝子を発現させるためには、エレクトロポレーション法 (Chu, G. et al. Nucl. Acid Res. 15, 1311-1326 (1987)), リン酸カルシウム法 (Chen, C and Okayama, H. Mol. Cell. Biol. 7, 2745-2752 (1987))、DEAEデキストラン法 (Lopata, M. A. et al. Nucl. Acids Res. 12, 5707-5717 (1984); Sussman, D. J. and Milman, G. Mol. Cell. Biol. 4, 1642-1643 (1985)), リポフェクチン法 (Derijard, B. Cell 7, 1025-1037 (1994); Lamb, B. T. et al. Nature Genetics 5, 22-30 (1993); Rabindran, S. K. et al. Science 259, 230-234 (1993))等の方法があるが、いずれの方法によってもよい。特異性の明らかとなっているモノクローナル抗体の認識部位 (エピトープ) を本発明のタンパク質のN 末または C末に導入することにより、モノクローナル抗体の認識部位を有する融合タンパク質として本発明のタンパク質を発現させることができる。用いるエピトープ-抗体系としては市販されているものを利用することができる (実験医学 13, 85-90 (1995))。マルチクローニングサイトを介して、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マルトース結合タンパク質、グルタチオンS-トランスフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP) などとの融合タンパク質を発現することができるベクターが市販されている。

#### 【0102】

融合タンパク質にすることにより本発明のタンパク質の性質をできるだけ変化させないようにするために数個から十数個のアミノ酸からなる小さなエピトープ部分のみを導入して、融合タンパク質を調製する方法も報告されている。例えば、ポリヒスチジン (His-tag)、インフルエンザ凝集素 HA、ヒトc-myc、FLAG、Vesicular stomatitis ウイルス糖タンパク質 (VSV-GP)、T7 gene10 タンパク質 (T7-tag)、ヒト単純ヘルペスウイルス糖タンパク質 (HSV-tag)、E-tag (モノクローナルファージ上のエピトープ) などのエピトープとそれを認識するモノクローナル抗体を、本発明のタンパク質に結合するタンパク質のスクリーニングのためのエピトープ-抗体系として利用できる (実験医学 13, 85-90 (1995))。

## 【0103】

免疫沈降においては、これらの抗体を、適当な界面活性剤を利用して調製した細胞溶解液に添加することにより免疫複合体を形成させる。この免疫複合体は本発明のタンパク質、それと結合能を有するタンパク質、および抗体からなる。上記エピトープに対する抗体を用いる以外に、本発明のタンパク質に対する抗体を利用して免疫沈降を行うことも可能である。本発明のタンパク質に対する抗体は、例えば、本発明のタンパク質をコードする遺伝子を適当な大腸菌発現ベクターに導入して大腸菌内で発現させ、発現させたタンパク質を精製し、これをウサギやマウス、ラット、ヤギ、ニワトリなどに免疫することで調製することができる。また、合成した本発明のタンパク質の部分ペプチドを上記の動物に免疫することによって調製することもできる。

## 【0104】

免疫複合体は、例えば、抗体がマウス IgG 抗体であれば、Protein A Sepharose や Protein G Sepharose を用いて沈降させることができる。また、本発明のタンパク質を、例えば、GSTなどのエピトープとの融合タンパク質として調製した場合には、グルタチオン-Sepharose 4Bなどのこれらエピトープに特異的に結合する物質を利用して、本発明のタンパク質の抗体を利用した場合と同様に、免疫複合体を形成させることができる。

## 【0105】

免疫沈降の一般的な方法については、例えば、文献 (Harlow, E. and Lane, D. : Antibodies, pp.511-552, Cold Spring Harbor Laboratory publications, New York (1988) ) 記載の方法に従って、または準じて行えばよい。

## 【0106】

免疫沈降されたタンパク質の解析には SDS-PAGE が一般的であり、適当な濃度のゲルを用いることでタンパク質の分子量により結合していたタンパク質を解析することができる。また、この際、一般的には本発明のタンパク質に結合したタンパク質は、クマシー染色や銀染色といったタンパク質の通常の染色法では検出することは困難であるので、放射性同位元素である  $^{35}\text{S}$ -メチオニンや  $^{35}\text{S}$ -システインを含んだ培養液で細胞を培養し、該細胞内のタンパク質を標識して、これ

を検出することで検出感度を向上させることができる。タンパク質の分子量が判明すれば直接SDS-ポリアクリルアミドゲルから目的のタンパク質を精製し、その配列を決定することもできる。

## 【0107】

また、本発明のタンパク質を用いて、該タンパク質に結合するタンパク質を単離する方法としては、例えば、ウエストウエスタンブロッティング法 (Skolnik, E. Y. et al., Cell (1991) 65, 83-90) を用いて行うことができる。すなわち、本発明のタンパク質と結合する結合タンパク質を発現していることが予想される細胞、組織、臓器 (例えば卵巣、精巣、胎盤などの組織や培養細胞など) よりファージベクター ( $\lambda$ gt11, ZAPなど) を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定し、精製して標識した本発明のタンパク質と上記フィルターとを反応させ、本発明のタンパク質と結合したタンパク質を発現するプラークを標識により検出すればよい。本発明のタンパク質を標識する方法としては、ビオチンとアビジンの結合性を利用する方法、本発明のタンパク質又は本発明のタンパク質に融合したペプチド又はポリペプチド (例えばGSTなど) に特異的に結合する抗体を利用する方法、ラジオアイソトープを利用する方法又は蛍光を利用する方法等が挙げられる。

## 【0108】

また、本発明のスクリーニング方法の他の態様としては、細胞を用いた 2-ハイブリッドシステム (Fields, S., and Sternglanz, R., Trends. Genet. (1994) 10, 286-292) を用いて行う方法が挙げられる。

## 【0109】

本発明のタンパク質をSRF DNA結合領域またはGAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離して大腸菌に導入して発現させる (酵母細胞内で本発明のタンパク質と結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる

）「twoハイブリッドシステム」（「MATCHMARKER Two-Hybrid System」,「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」,「MATCHMAKER One-Hybrid System」（いずれもClontech社製）、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」（Stratagene社製）、文献「Dalton S, and Treisman R (1992)Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」）を利用して、本発明のタンパク質に結合するタンパク質またはその遺伝子を調製することも可能である。

【0110】

レポーター遺伝子としては、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子等を用いることができる。

【0111】

本発明のタンパク質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、本発明のタンパク質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに本発明のタンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、本発明のタンパク質に結合したタンパク質を調製することができる。

【0112】

得られたタンパク質は、そのアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク質をコードするDNAを得ることができる。

【0113】

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは本発明のタンパク質と被検化合物との間の相互作用を微量のタンパク質を用いてかつ標識することなく、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore、Pharmacia製）。したがって、BIAcore等のバイオセンサーを用いることにより本

発明のタンパク質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

【0 1 1 4】

また、タンパク質に限らず、本発明のタンパク質に結合する化合物（アゴニスト、およびアンタゴニストを含む）を単離する方法としては、例えば、固定した本発明のタンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法や、コンビナトリアルケミストリー技術によるハイスループットを用いたスクリーニング方法（Wrighton NC; Farrell FX; Chang R; Kashyap AK; Barbone FP; Mulcahy LS; Johnson DL; Barrett RW; Jolliffe LK; Dower WJ., Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin, Science (UNITED STATES) Jul 26 1996, 273 p458-64, Verdine GL., The combinatorial chemistry of nature. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p11-13, Hogan JC Jr., Directed combinatorial chemistry. Nature (ENGLAND) Nov 7 1996, 384 p17-9）が当業者に公知である。

【0 1 1 5】

スクリーニングにより単離され得る化合物は、本発明のタンパク質の機能異常などに起因する疾患や癌などの細胞増殖性疾患などの治療や予防において、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害するための薬剤の候補となる。本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、本発明のタンパク質に結合する活性を有する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物に含まれる。

【0 1 1 6】

また、本発明は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングする方法に関する。本発明のGros1タンパク質は細胞増殖を抑制する活性を有することから、この活性を指標に、本発明のGros1タンパク質の活性を促進または阻害する化合物をスクリーニングすることが可能である。

【0 1 1 7】

このスクリーニング方法は、（a）被検試料存在下で、Gros1タンパク質を発現する細胞を培養する工程、（b）該細胞の増殖を検出する工程、（c）被検試

料非存在下で検出した場合と比較して、該増殖を促進または抑制する化合物を選択する工程、を含む。

## 【0 1 1 8】

スクリーニングに用いられるGros1タンパク質としては、細胞の増殖を抑制する活性を有する限り特に制限はない。例えば、ヒトまたはマウスのGros1-Lタンパク質が挙げられるが、これらタンパク質と機能的に同等なタンパク質を用いることが可能である。また、Gros1タンパク質は、細胞が内因的に発現するものであっても、外来的に発現するものであってもよい。

## 【0 1 1 9】

被検試料としては特に制限はなく、例えば、細胞抽出物、細胞培養上清、発酵微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、精製若しくは粗精製タンパク質、ペプチド、非ペプチド性化合物、合成低分子化合物、天然化合物が挙げられる。また、上記の本発明のタンパク質に結合する化合物のスクリーニングで得られた化合物を被検化合物として用いることも可能である。

## 【0 1 2 0】

このスクリーニングにより単離される化合物は、本発明のタンパク質のアゴニストやアンタゴニストの候補になる。「アゴニスト」とは、本発明のタンパク質に結合することにより、その機能を活性化する分子を指す。また、「アンタゴニスト」とは、本発明のタンパク質に特異的に結合することによってその機能を抑制する分子を指す。さらに、生体内において、本発明のタンパク質と相互作用する分子(DNAやタンパク質を含む)との相互作用を阻害する化合物の候補となる。

## 【0 1 2 1】

細胞増殖の検出は、例えば、実施例に記載のようにコロニー形成率を測定することにより検出するほか、細胞の増殖速度の決定、細胞周期の測定などにより行うことができる。

## 【0 1 2 2】

これらスクリーニングにより単離された化合物は、本発明のタンパク質の活性を促進または阻害するための薬剤の候補となり、本発明のタンパク質が関与する疾患（例えば癌など）の治療への応用が考えられる。

## 【0123】

なお、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる、Gros1タンパク質の活性を促進または阻害する化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される物質も、本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物に含まれる。

## 【0124】

本発明のスクリーニング方法を用いて得られる化合物をヒトや哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、ウサギ、ニワトリ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ブタ、ウシ、サル、マントビビ、チンパンジーの医薬として使用する場合には、単離された化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化して投与を行うことも可能である。例えば、必要に応じて糖衣を施した錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤として経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤などと適宜組み合わせ、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することが考えられる。これら製剤における有効成分量は指示された範囲の適当な容量が得られるようにするものである。

## 【0125】

錠剤、カプセル剤に混和することができる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような賦形剤、コーンスターチ、ゼラチン、アルギン酸のような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、アカモノ油又はチェリーのような香味剤が用いられる。調剤単位形態がカプセルである場合には、上記の材料にさらに油脂のような液状担体を含有することができる。注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施に従って処方することができる。

## 【0126】

注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80 (TM)、HCO-50と併用してもよい。

## 【0127】

油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、無痛化剤、例えば、塩酸プロカイン、安定剤、例えばベンジルアルコール、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

## 【0128】

患者への投与は、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射などのほか、鼻腔内的、経気管支的、筋内的、または経口的に当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与量、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

## 【0129】

例えば、本発明のタンパク質と結合する化合物や本発明のタンパク質の活性を阻害する化合物の投与量は、症状により差異はあるが、経口投与の場合、一般的に成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.1から100mg、好ましくは約1.0から50mg、より好ましくは約1.0から20mgである。

## 【0130】

非経口的に投与する場合は、その1回投与量は投与対象、対象臓器、症状、投与方法によっても異なるが、例えば注射剤の形では通常成人（体重60kgとして）においては、1日あたり約0.01から30mg、好ましくは約0.1から20mg、より好まし

くは約0.1から10mg程度を静脈注射により投与するのが好都合である。他の動物の場合も、体重60kgあたりに換算した量を投与することができる。

#### 【0131】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### 【0132】

##### 【実施例】

##### 【実施例1】 Gros1 cDNAのクローニングとシーケンス

マウス正常細胞 (CMEF) および不死化細胞 (NIH3T3) の原形質膜のTriton X-100不溶画分に含まれるタンパク質の比較により、NIH3T3に存在する約30kDaのタンパク質 (p33) が、CMEFには含まれていないことが判明している (Wadhwa, R. et al (1991) *Mutat. Res.* 256, 243-54)。SDS-PAGEによりこのタンパク質を単離し、常法により抗p33ポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いたイムノスクリーニングにより、RS-4細胞 cDNAライブラリー (Wadhwa, R. et al (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 6615-21) から、新規の遺伝子Gros1-Lを得た。この遺伝子の配列はDNA配列データベース内に相同性を見いだせない新規物質であった。また、ヒト精巣ライブラリー (pCMV-SPORT (GIBCO BRL Cat#.10419-018) をベースにして作製した; D'Alessio et al., 1990, *Focus* 12, 47; Kriegler, M., 1990, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual*, Stockton Press, New York, NY.; Sambrook, J. et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.; Li, W.-B. et al., 1994, *BioTechniques* 16, 722) から<sup>32</sup>P ラベルしたマウスGros1プローブを用いスクリーニングを行ったところ、2種類のクローン (ヒト Gros1-LおよびGros1-S) を得た。得られたマウス Gros1 cDNA断片の塩基配列を用いてESTデータを検索し、オーバーラップしたクローンを繋ぎ合わせることで、マウス Gros1-S を同定した (図1)。このESTには、マウスGros1-Lや他のESTと比べ94bpの欠失が認められ、欠失のない型 (マウスGros1-L) に比べ短いタンパク質 (マウスGros1-S) が生じると予想された。

#### 【0133】

マウスGros1-L cDNAの全塩基配列を配列番号：5に、EST検索を用いたクローニングより得られたマウスGros1-S cDNAの全塩基配列を配列番号：7に示す。また、それらの塩基配列から導出されるアミノ酸配列をそれぞれ配列番号：6および8に示す。得られたそれぞれの全長 cDNA配列は、DNA配列データベース内に相同性が見いだせなかった。イムノスクリーニングで得られたcDNA（マウスGros1-L）は747アミノ酸からなる85kDaを、EST検索を用いたクローニングより得られたcDNAは542アミノ酸からなる61.5kDaのマウスGros1-Sタンパク質をコードし（図2）、タンパク質データベース内に有意に一致するものが見いだせなかった。また、マウスGros1と83.9%の相同性を持つ上記ヒト3.0KbクローンcDNA（配列番号：1）と2.7kbクローンのcDNA（配列番号：3）に関してもDNA配列データベース内に相同性が見いだせなかった。また、得られた3.0KbクローンcDNA（配列番号：1）は363アミノ酸（配列番号：2）からなる41kDaのヒトGros1-Sを、2.7kbクローンのcDNA（配列番号：3）は736アミノ酸（配列番号：4）からなる83kDaのヒトGros1-Lタンパク質をコードし（図3）、タンパク質データベース内に有意に一致するものが見いだせなかった。しかし、DNA配列の一致は見られなかったものの、モチーフ検索によるアミノ酸配列の解析の結果、マウス、およびヒトのGros1-Lのアミノ酸配列は部分的に転写因子に多く見られるロイシンジッパー構造を有していた。

【0 1 3 4】

#### 【実施例2】 組み換えGros1の調製

マウスGros1-L cDNAのオープンリーディングフレームのうち、183-1055番目のcDNAを、BamHIサイトを有するセンスプライマー（配列番号：9）およびHindIIIサイトを有するアンチセンスプライマー（配列番号：10）を用いてPCR反応（94℃ 1分、55℃ 1分、72℃ 3分、25サイクル）を行い、得られたPCR産物を、Rapid Ligation Kit（ベーリンガーマンハイム）を用いてpGEM-T easyベクター（プロメガ）に挿入した。大腸菌JM109コンピテントセル（東洋紡）とベクターとの混合液を42℃で1分間処理した後、アンピシリンプレートに撒き、一日培養後、コロニーを拾いクローニングした。ヒスチジン融合タンパク質を調製するために、クローニングしたpGEM-T/Gros1ベクターをBamHI-HindIIIで切断し、同様の部

位で切断したpQE30 (キアゲン) に上記と同様の方法でライゲーションし、コロニーを拾いプラスミドを回収した。大腸菌 M15 (キアゲン) を、580nmでの吸光度が0.6になるまで培養後、回収したプラスミドで形質転換し、IPTG 0.2mMを用いて37℃で3時間誘導してタンパク質を産生させた。この大腸菌の溶解物をSDS-PAGE法で分離し、ヒスチジン抗体および、後述するGros1抗体を用いたウェスタンブロッティングにより検出した。その結果40kDaのタンパク質が合成されていることが確認された。組み換えタンパク質の大きさは予想されたものと同じであった。また、抗p33ポリクローナル抗体を用いて、同様にウェスタンブロッティングを行ったところ、シグナルは検出されなかった。

### 【 0 1 3 5 】

#### [実施例 3] ノーザンブロット解析

マウス、ヒトの様々な組織のmRNAをレーンあたり2 $\mu$ gのせたメンブレン (Clontech laboratories, Palo alto, CA) を購入し、ノーザンブロット解析を行った。プローブはマウスGros1-Lプラスミドの遺伝子断片をプローブとして用いた。ハイブリダイゼーション条件は「Rapid-hyb buffer」 (Amersham LIFE SCIENCE 社製) を用い、68℃で30分プレハイブリダイゼーションを行った後、標識したプローブを添加し、68℃で2時間保温することによりハイブリダイゼーションを行った。その後、2XSSC、0.01% SDS中、室温で20分の洗浄を3回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS中、37℃で20分の洗浄を3回、次いで、1 x SSC、0.1% SDS中、50℃で20分の洗浄を2回行った。検出はオートラジオグラフィーによって行った。また、ノーザンブロット解析により、ヒトでは4.4kbと2.5kbのバンドが、精巣、卵巣、胎盤をのぞく、ほとんどの組織で弱く発現していた。一方、精巣、卵巣、胎盤においては非常に高い発現を示していた (図4)。また、ヒト培養細胞においては組織よりも高いmRNAの発現を示していた。さらに、ヒト正常培養細胞においては、2.5kb mRNAが4.4kbのmRNAの10倍近い発現量を示した (図5)。マウスにおいても3.5kbと2.5kbのバンドが、脳と脾臓と精巣をのぞくほとんどの組織で弱く発現していた。脳と脾臓では発現が見られず、精巣では2.5kbのみが発現していた。精巣及び卵巣においてはGros1 mRNAのうちの短いタイプのものしか検出されなかった。発生過程における発現は発生過程11日目において劇的に発現が消失

することが示された（図 6）。

【0 1 3 6】

〔実施例 4〕 染色体上の配置

ヒトGros1に特異的なセンスプライマー（配列番号：1 1）及びアンチセンスプライマー（配列番号：1 2）を用い、ラディエーションハイブリッドパネルを用いて、決定した。その結果ヒトでは染色体1p31に存在することが示された。また、マウスでは染色体4番に存在することが推定された。

【0 1 3 7】

〔実施例 5〕 Gros1タンパク質に結合する特異抗体の作製

Gros1の遺伝子配列から予測される組換えタンパク質に対する抗体を作製した。具体的には、実施例 2 において作製したヒスチジンタグを付けた組換えマウスGros1-Lタンパク質をニッケルカラムで精製後、ウサギに免疫し、4回に分けて段階的に血清を抽出し、最終的には全採血を行った。この血清をプロテインAカラムにより精製しポリクローナル抗体を調製した。この抗体を用いて、ヒスチジンを融合させた組換えヒトGros1-Lタンパク質をSDS-PAGE法を用いたゲル上での分離し、ウェスタンブロッティング法によって検出することによって、この抗Gros1ポリクローナル抗体がGros1タンパク質を認識することを確認した。

【0 1 3 8】

〔実施例 6〕 ウェスタンブロット解析

上記の抗Gros1ポリクローナル抗体を用いてヒト正常肺繊維芽細胞 MRC-5の溶解物を用いてウェスタンブロットを行ったところ、cDNA配列から予想される約83 kDaおよび約41kDaのバンドが検出された。2つのバンドが検出されたことは、ノーザン解析で約4.4および約2.5kbの2種の転写産物が検出された事実と一致している。興味深いことに、ノーザン解析で長い方のバンドしか検出されなかったHeLa細胞は、ウェスタン解析では83kDaのバンドしか検出されなかった。また、NIH 3T3細胞においても、抗Gros1抗体により約85kDaのバンドが検出された他、61.5、41、34、および32kDaのバンドも検出された。約85kDaのバンドはマウスGros1-Lに、61.5kDaのバンドはマウスGros1-Sに対応しており、その他のバンドは内因的に切断されたり修飾されたタンパク質である可能性が考えられる。COS7細胞に

においては、60、40、および34kDaのバンドが検出された。ヒトGros1-LまたはSをコードするcDNAを発現ベクターに組み込み、COS7細胞にトランスフェクションした。発現ベクターとしては、ヒト精巣ライブラリースクリーニングの際に用いたpCMV-SPORT Vector (GIBCO BRL) をそのまま使用した。抗Gros1抗体を用いたウェスタンブロット解析の結果、それぞれのcDNA配列に対応する83kDaまたは41kDaのバンドが検出された。また、後述のGFP-Gros1融合タンパク質をコードするこのプラスミドをトランスフェクションしたCOS7細胞では、Gros1-LまたはGros1-Sに対応するサイズ（それぞれ115および72kDa）のタンパク質が作られていることが、SDS-PAGE後のウェスタンブロット解析により確認された。

## 【0139】

## [実施例7] 細胞内での局在

ヒトGros1-LおよびSに対応する2種類のオープンリーディングフレームを持つように設計されたセンス（配列番号：13）及びアンチセンス（配列番号：14、15）プライマーを用い2種類のヒトGros1 cDNAの遺伝子をPCRにて増幅した。これらの遺伝子をpEGFP-C1（クローンテック）中のGFP ORFのC末端領域に挿入し、ヒトGros1-Sの融合タンパク質を発現する「GFPC1/7-3.0」、およびヒトGros1-Lの融合タンパク質を発現する「GFPC1/7-2.7」を作成した。GFP-Gros1融合タンパク質をコードするこれらのプラスミドおよび対照のGFPのみをコードするプラスミドをカバーガラス上で生育しているCOS7細胞にTfx-50（Promega社製）を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション24時間後、細胞を4%ホルムアルデヒドで固定し、PBSで3回洗浄した。細胞はエピフルオレッセンス光学系のオリンパスBH-2顕微鏡で観察した。その結果、2種類のGros1全配列を融合させたタンパク質はそれぞれ細胞質内に局在していた（図7、8）。

## 【0140】

## [実施例8] 増殖抑制活性

スクリーニングにより単離されたマウス Gros1-LのN末端369アミノ酸のみをコードするGros1ミュータント cDNA/pBluescriptをEcoRIで切り出し、実施例2と同様の方法で、EcoRIで制限酵素処理したSR $\alpha$ 発現ベクター（Mol. Cell. Biol. (1988) 8, 466-472）にライゲーションした。その結果、センス向きとアンチセ

ンス向きの両方のクローンを得た。一方、マウスのGros1の全長をコードする遺伝子を単離するために、まず、マウスのGros1とホモロジーのあったESTクローン AA49892A をGenome System社より購入した。次に、ScaI - NotI部位でそのESTクローンを、またGros1 cDNA/pBulescript を同様の部位で制限酵素処理し、これらの遺伝子断片を実施例2と同様の方法でライゲーションを行い、マウスGros1-L遺伝子を得た。さらに、このGros1-L遺伝子断片をEcoRI - NotIで制限酵素処理し、同様の部位で制限酵素処理したSR $\alpha$ 発現ベクターに実施例2と同様の方法でライゲーションした。その結果、マウスのGros1-Lを発現するSR $\alpha$ /Gros1-Lセンスクローンを単離した。

## 【0141】

これらのベクターをNIH3T3細胞に遺伝子導入し、6つのG418耐性のクローンを得、それぞれのGros1の発現をノーザンブロットによって確認した(図9)。これらの中で特に高い発現をしているセンス向きのクローン、および内因性のGros1転写産物がノーザン解析でほとんど検出されないアンチセンス向きのクローンをコロニー形成試験に供した。

## 【0142】

10cmディッシュに各クローン500細胞を播き、3日おきに培地を交換して2週間培養した。その後、4%ホルムアルデヒドを含むPBSで固定し、メチレンブルーで染色後、コロニー数を数えた。実験は3連で行った。

## 【0143】

その結果、センス向きのGros1-Lをトランスフェクションしたクローンではコロニー形成が著しく遅れたのに対し、アンチセンス向きのGros1-Lをトランスフェクションしたクローンでは対照に比べ、約5倍高いコロニー形成能を示した(図10、表1)。また、センス向きのGros1-ミュータントではコロニー形成の低下が見られなかった(表1の「欠失コロニー」)。この結果から、Gros1タンパクは増殖抑制活性をもつことが示された。

## 【0144】

## 【表1】

クローン細胞	コロニー数	
	ディッシュ 1	ディッシュ 2
対照コロニー		
対照702	197	150
対照733	223	106
センスコロニー		
NIH3T3/7-7m3 S2	38	42
NIH3T3/7-7m3 S4	23	40
NIH3T3/7-7m3 S5	40	60
NIH3T3/7-7m3 S6	33	9
NIH3T3/7-7m3 S10	39	16
アンチセンスコロニー		
# 723	181	186
# AS1	190	169
# AS2	276	336
# AS3	398	341
# AS10	209	187
# AS12	233	254
欠失コロニー		
# 715	201	215
# 719	179	193
# 774	156	113
# 784	103	117
# 738	97	80

【 0 1 4 5 】

【発明の効果】

多くの悪性腫瘍において、ヒト染色体1p上にランダムではない遺伝子変異があることが、細胞遺伝学及び分子生物学的なアプローチにより示唆されてきた。これらの事実から、染色体1pにおける一つまたは複数の遺伝子変異が悪性腫瘍に重要であると考えられている。本発明のヒトGros1遺伝子は染色体1p領域に存在し、腫瘍を抑制する活性を持つことから、これらの疾患の原因遺伝子である可能性を持つ。そのため、本発明のタンパク質や遺伝子、または本発明のタンパク質の活性を促進する化合物は、細胞増殖に関与する新たな因子の精製やクローニング、さらには様々な腫瘍に対する治療や予防を行うための医薬品の開発のための有用なツールとして利用しうる。

【0146】

【配列表】

# SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI RESEARCH INSTITUTE FOR MOLECULAR MEDICINE, INC.

<120> Tumor suppressor genes

<130> C1-104

<140>

<141>

<160> 15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 2829

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (52)..(1140)

<400> 1

ctccggcctt ggtggcgggt ggctggcgggt tccgttaggt ctgagggagc g atg gcg 57

Met Ala

1

gta cgc gcg ttg aag ctg ctg acc aca ctg ctg gct gtc gtg gcc gct 105

Val Arg Ala Leu Lys Leu Leu Thr Thr Leu Leu Ala Val Val Ala Ala

5

10

15

gcc tcc caa gcc gag gtc gag tcc gag gca gga tgg ggc atg gtg acg 153

Ala Ser Gln Ala Glu Val Glu Ser Glu Ala Gly Trp Gly Met Val Thr

20

25

30

cct gat ctg ctc ttc gcc gag ggg acc gca gcc tac gcg cgc ggg gac 201

Pro Asp Leu Leu Phe Ala Glu Gly Thr Ala Ala Tyr Ala Arg Gly Asp

35

40

45

50

tgg ccc ggg gtg gtc ctg agc atg gaa cgg gcg ctg cgc tcc cgg gca 249

Trp Pro Gly Val Val Leu Ser Met Glu Arg Ala Leu Arg Ser Arg Ala

55

60

65

gcc ctc cgc gcc ctt cgc ctg cgc tgc cgc acc cag tgt gcc gcc gac 297

Ala Leu Arg Ala Leu Arg Leu Arg Cys Arg Thr Gln Cys Ala Ala Asp

70

75

80

ttc ccg tgg gag ctg gac ccc gac tgg tcc ccc agc ccg gcc cag gcc 345

Phe Pro Trp Glu Leu Asp Pro Asp Trp Ser Pro Ser Pro Ala Gln Ala

85

90

95

tcg ggc gcc ggc gcc ctg cgc gac ctg agc ttc ttc ggg ggc ctt ctg 393

Ser Gly Ala Gly Ala Leu Arg Asp Leu Ser Phe Phe Gly Gly Leu Leu

100

105

110

cgt cgc gct gcc tgc ctg cgc cgc tgc ctc ggg ccg ccg gcc gcc cac 441

Arg Arg Ala Ala Cys Leu Arg Arg Cys Leu Gly Pro Pro Ala Ala His

115

120

125

130

tcg ctc agc gaa gag atg gag ctg gag ttc cgc aag cgg agc ccc tac 489

Ser Leu Ser Glu Glu Met Glu Leu Glu Phe Arg Lys Arg Ser Pro Tyr

135

140

145

aac tac ctg cag gtc gcc tac ttc aag atc aac aag ttg gag aaa gct 537

Asn Tyr Leu Gln Val Ala Tyr Phe Lys Ile Asn Lys Leu Glu Lys Ala

150

155

160

gtt gct gca gca cac acc ttc ttc gtg ggc aat cct gag cac atg gaa 585

Val Ala Ala Ala His Thr Phe Phe Val Gly Asn Pro Glu His Met Glu

165

170

175

atg cag cag aac cta gac tat tac caa acc atg tct gga gtg aag gag 633

Met Gln Gln Asn Leu Asp Tyr Tyr Gln Thr Met Ser Gly Val Lys Glu

180

185

190

gcc gac ttc aag gat ctt gag act caa ccc cat atg caa gaa ttt cga 681

Ala Asp Phe Lys Asp Leu Glu Thr Gln Pro His Met Gln Glu Phe Arg

195 200 205 210

ctg gga gtg cga ctc tac tca gag gaa cag cca cag gaa gct gtg ccc 729

Leu Gly Val Arg Leu Tyr Ser Glu Glu Gln Pro Gln Glu Ala Val Pro

215 220 225

cac cta gag gcg gcg ctg caa gaa tac ttt gtg gcc tat gag gag tgc 777

His Leu Glu Ala Ala Leu Gln Glu Tyr Phe Val Ala Tyr Glu Glu Cys

230 235 240

cgt gcc ctc tgc gaa ggg ccc tat gac tac gat ggc tac aac tac ctt 825

Arg Ala Leu Cys Glu Gly Pro Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu

245 250 255

gag tac aac gct gac ctc ttc cag gcc atc aca gat cat tac atc cag 873

Glu Tyr Asn Ala Asp Leu Phe Gln Ala Ile Thr Asp His Tyr Ile Gln

260 265 270

gtc ctc aac tgt aag cag aac tgt gtc acg gag ctt gct tcc cac cca 921

Val Leu Asn Cys Lys Gln Asn Cys Val Thr Glu Leu Ala Ser His Pro

275 280 285 290

agt cga gag aag ccc ttt gaa gac ttc ctc cca tcg cat tat aat tat 969

Ser Arg Glu Lys Pro Phe Glu Asp Phe Leu Pro Ser His Tyr Asn Tyr

295 300 305

ctg cag ttt gcc tac tat aac att ggg aat tat aca caa gct ggt gaa 1017

Leu Gln Phe Ala Tyr Tyr Asn Ile Gly Asn Tyr Thr Gln Ala Gly Glu

310

315

320

tgt gcc aag acc tat ctt ctc ttc ttc ccc aat gac gag gtg atg aac 1065

Cys Ala Lys Thr Tyr Leu Leu Phe Phe Pro Asn Asp Glu Val Met Asn

325

330

335

caa aat ttg gcc tat tat gca gct atg ctt gga gaa gaa cac acc aga 1113

Gln Asn Leu Ala Tyr Tyr Ala Ala Met Leu Gly Glu Glu His Thr Arg

340

345

350

tcc atc ggc ccc cgt gag cag ggc acc tagggaaaga tgtgaccccg 1160

Ser Ile Gly Pro Arg Glu Gln Gly Thr

355

360

gaaagtactc agtttccttg ccctggagtg ccaaggagta ccgacagcga agcctactgg 1220

aaaaagaact gcttttcttc gcttatgatg tttttggaat tccctttgtg gatcgggatt 1280

catggactcc agaagaaatg attcccaaga aattgcaaga gaaacagaag tgaggacctt 1340

gaagaaactg catggttgga tcagtctgat gaagcacttg aggcttcttg agcccaggca 1400

gatgtgaact cctggcaagg ggtgggcagg tccagtttgg gaagtcggggg tggagcccag 1460

ggctggccct ggaatgcagt cctcagagcg gttgtgctca taggtcagaa cgggaaacag 1520

ccgtacgcat ctcccaggag attgggaacc ttatgaagga aatcgagacc cttgtggaag 1580

agaagaccaa ggagtcactg gatgtgagca gactgacccg ggaaggtggc cccctgctgt 1640

atgaaggcat cagtctcacc atgaactcca aactcctgaa tggttaccag cgggtgggtga 1700

tggacggcgt aatctctgac cacgagtgtc aggagctgca gagactgacc aatgtggcag 1760

caacctcagg agatggctac cggggtcaga cctccccaca tactcccaat gaaaagttct 1820

atggtgtcac tgtcttcaaa gccctcaagc tggggcaaga aggcaaagtt cctctgcaga 1880

gtgcccacct gtactacaac gtgacggaga aagtgcggcg catcatggag tcctacttcc 1940

gcctggatac gcccctctac ttttcctact ctcatctggt gtgccgcact gccatcgaag 2000

aggccaggc agagaggaag gatgatagtc atccagtcca cgtggacaac tgcacacctga 2060

atgccgagac cctcgtgtgt gtcaaagagc cccagccta caccttccgc gactacagcg 2120

ccatccttta cctaaatggg gacttcgatg gcggaaactt ttatttcact gaactggatg 2180

ccaagaccgt gacggcagag gtgcagcctc agtgtggaag agccgtggga ttctcttcag 2240

gcactgaaaa cccacatgga gtgaaggctg tcaccagggg gcagcgctgt gccatcgccc 2300

tgtggttcac cctggaccct cgacacagcg agcgggacag ggtgcaggca gatgacctgg 2360

tgaagatgct cttcagccca gaagagatgg acctctccca ggagcagccc ctggatgccc 2420

agcagggccc ccccgaaact gcacaagagt ctctctcagg cagtgaatcg aagcccaagg 2480  
 atgagctatg acagcgtcca ggtcagacgg atgggtgact agacctatga agaggaactc 2540  
 ttcttgcaact ctgagctggc cagcccctcg gggctgcaga gcagtgcagc tacatctgcc 2600  
 actcagccga ggggaccctg ctacacagcct tctacatggt gctactgctc ttggagtgga 2660  
 catgaccaga caccgcaccc cctggatctg gctgagggct caggacacag gccagccac 2720  
 cccaggggc ctccacaggc cgctgcataa cagcgataca gtacttaagt gtctgtgtag 2780  
 acaaccaaag aataaatgat tcatggtttt ttttaaaaaa aaaaaaaaaa 2829

<210> 2

<211> 363

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Ala Val Arg Ala Leu Lys Leu Leu Thr Thr Leu Leu Ala Val Val

1

5

10

15

Ala Ala Ala Ser Gln Ala Glu Val Glu Ser Glu Ala Gly Trp Gly Met

20

25

30

Val Thr Pro Asp Leu Leu Phe Ala Glu Gly Thr Ala Ala Tyr Ala Arg

35

40

45

Gly Asp Trp Pro Gly Val Val Leu Ser Met Glu Arg Ala Leu Arg Ser  
50 55 60

Arg Ala Ala Leu Arg Ala Leu Arg Leu Arg Cys Arg Thr Gln Cys Ala  
65 70 75 80

Ala Asp Phe Pro Trp Glu Leu Asp Pro Asp Trp Ser Pro Ser Pro Ala  
85 90 95

Gln Ala Ser Gly Ala Gly Ala Leu Arg Asp Leu Ser Phe Phe Gly Gly  
100 105 110

Leu Leu Arg Arg Ala Ala Cys Leu Arg Arg Cys Leu Gly Pro Pro Ala  
115 120 125

Ala His Ser Leu Ser Glu Glu Met Glu Leu Glu Phe Arg Lys Arg Ser  
130 135 140

Pro Tyr Asn Tyr Leu Gln Val Ala Tyr Phe Lys Ile Asn Lys Leu Glu  
145 150 155 160

Lys Ala Val Ala Ala Ala His Thr Phe Phe Val Gly Asn Pro Glu His  
165 170 175

Met Glu Met Gln Gln Asn Leu Asp Tyr Tyr Gln Thr Met Ser Gly Val  
180 185 190

Lys Glu Ala Asp Phe Lys Asp Leu Glu Thr Gln Pro His Met Gln Glu

195

200

205

Phe Arg Leu Gly Val Arg Leu Tyr Ser Glu Glu Gln Pro Gln Glu Ala

210

215

220

Val Pro His Leu Glu Ala Ala Leu Gln Glu Tyr Phe Val Ala Tyr Glu

225

230

235

240

Glu Cys Arg Ala Leu Cys Glu Gly Pro Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Asn

245

250

255

Tyr Leu Glu Tyr Asn Ala Asp Leu Phe Gln Ala Ile Thr Asp His Tyr

260

265

270

Ile Gln Val Leu Asn Cys Lys Gln Asn Cys Val Thr Glu Leu Ala Ser

275

280

285

His Pro Ser Arg Glu Lys Pro Phe Glu Asp Phe Leu Pro Ser His Tyr

290

295

300

Asn Tyr Leu Gln Phe Ala Tyr Tyr Asn Ile Gly Asn Tyr Thr Gln Ala

305

310

315

320

Gly Glu Cys Ala Lys Thr Tyr Leu Leu Phe Phe Pro Asn Asp Glu Val

325

330

335

Met Asn Gln Asn Leu Ala Tyr Tyr Ala Ala Met Leu Gly Glu Glu His

340

345

350

Thr Arg Ser Ile Gly Pro Arg Glu Gln Gly Thr

355

360

<210> 3

<211> 2600

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (52)..(2259)

<400> 3

ctccggcctt ggtggcgggt ggctggcgggt tccgttaggt ctgagggagc g atg gcg 57

Met Ala

1

gta cgc gcg ttg aag ctg ctg acc aca ctg ctg gct gtc gtg gcc gct 105

Val Arg Ala Leu Lys Leu Leu Thr Thr Leu Leu Ala Val Val Ala Ala

5

10

15

gcc tcc caa gcc gag gtc gag tcc gag gca gga tgg ggc atg gtg acg 153

Ala Ser Gln Ala Glu Val Glu Ser Glu Ala Gly Trp Gly Met Val Thr

20

25

30

cct gat ctg ctc ttc gcc gag ggg acc gca gcc tac gcg cgc ggg gac 201

Pro Asp Leu Leu Phe Ala Glu Gly Thr Ala Ala Tyr Ala Arg Gly Asp

35

40

45

50

tgg ccc ggg gtg gtc ctg agc atg gaa cgg gcg ctg cgc tcc cgg gca	249
Trp Pro Gly Val Val Leu Ser Met Glu Arg Ala Leu Arg Ser Arg Ala	
55 60 65	
gcc ctc cgc gcc ctt cgc ctg cgc tgc cgc acc cag tgt gcc gcc gac	297
Ala Leu Arg Ala Leu Arg Leu Arg Cys Arg Thr Gln Cys Ala Ala Asp	
70 75 80	
ttc ccg tgg gag ctg gac ccc gac tgg tcc ccc agc ccg gcc cag gcc	345
Phe Pro Trp Glu Leu Asp Pro Asp Trp Ser Pro Ser Pro Ala Gln Ala	
85 90 95	
tcg ggc gcc ggc gcc ctg cgc gac ctg agc ttc ttc ggg ggc ctt ctg	393
Ser Gly Ala Gly Ala Leu Arg Asp Leu Ser Phe Phe Gly Gly Leu Leu	
100 105 110	
cgt cgc gct gcc tgc ctg cgc cgc tgc ctc ggg ccg ccg gcc gcc cac	441
Arg Arg Ala Ala Cys Leu Arg Arg Cys Leu Gly Pro Pro Ala Ala His	
115 120 125 130	
tcg ctc agc gaa gag atg gag ctg gag ttc cgc aag cgg agc ccc tac	489
Ser Leu Ser Glu Glu Met Glu Leu Glu Phe Arg Lys Arg Ser Pro Tyr	
135 140 145	
aac tac ctg cag gtc gcc tac ttc aag atc aac aag ttg gag aaa gct	537
Asn Tyr Leu Gln Val Ala Tyr Phe Lys Ile Asn Lys Leu Glu Lys Ala	
150 155 160	

gtt gct gca gca cac acc ttc ttc gtg ggc aat cct gag cac atg gaa 585  
Val Ala Ala Ala His Thr Phe Phe Val Gly Asn Pro Glu His Met Glu

165

170

175

atg cag cag aac cta gac tat tac caa acc atg tct gga gtg aag gag 633  
Met Gln Gln Asn Leu Asp Tyr Tyr Gln Thr Met Ser Gly Val Lys Glu

180

185

190

gcc gac ttc aag gat ctt gag act caa ccc cat atg caa gaa ttt cga 681  
Ala Asp Phe Lys Asp Leu Glu Thr Gln Pro His Met Gln Glu Phe Arg

195

200

205

210

ctg gga gtg cga ctc tac tca gag gaa cag cca cag gaa gct gtg ccc 729  
Leu Gly Val Arg Leu Tyr Ser Glu Glu Gln Pro Gln Glu Ala Val Pro

215

220

225

cac cta gag gcg gcg ctg caa gaa tac ttt gtg gcc tat gag gag tgc 777  
His Leu Glu Ala Ala Leu Gln Glu Tyr Phe Val Ala Tyr Glu Glu Cys

230

235

240

cgt gcc ctc tgc gaa ggg ccc tat gac tac gat ggc tac aac tac ctt 825  
Arg Ala Leu Cys Glu Gly Pro Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu

245

250

255

gag tac aac gct gac ctc ttc cag gcc atc aca gat cat tac atc cag 873  
Glu Tyr Asn Ala Asp Leu Phe Gln Ala Ile Thr Asp His Tyr Ile Gln

260

265

270

gtc ctc aac tgt aag cag aac tgt gtc acg gag ctt gct tcc cac cca 921

Val Leu Asn Cys Lys Gln Asn Cys Val Thr Glu Leu Ala Ser His Pro

275 280 285 290

agt cga gag aag ccc ttt gaa gac ttc ctc cca tcg cat tat aat tat 969

Ser Arg Glu Lys Pro Phe Glu Asp Phe Leu Pro Ser His Tyr Asn Tyr

295 300 305

ctg cag ttt gcc tac tat aac att ggg aat tat aca caa gct ggt gaa 1017

Leu Gln Phe Ala Tyr Tyr Asn Ile Gly Asn Tyr Thr Gln Ala Gly Glu

310 315 320

tgt gcc aag acc tat ctt ctc ttc ttc ccc aat gac gag gtg atg aac 1065

Cys Ala Lys Thr Tyr Leu Leu Phe Phe Pro Asn Asp Glu Val Met Asn

325 330 335

caa aat ttg gcc tat tat gca gct atg ctt gga gaa gaa cac acc aga 1113

Gln Asn Leu Ala Tyr Tyr Ala Ala Met Leu Gly Glu Glu His Thr Arg

340 345 350

tcc atc ggc ccc cgt gag agt gcc aag gag tac cga cag cga agc cta 1161

Ser Ile Gly Pro Arg Glu Ser Ala Lys Glu Tyr Arg Gln Arg Ser Leu

355 360 365 370

ctg gaa aaa gaa ctg ctt ttc ttc gct tat gat gtt ttt gga att ccc 1209

Leu Glu Lys Glu Leu Leu Phe Phe Ala Tyr Asp Val Phe Gly Ile Pro

375 380 385

ttt gtg gat ccg gat tca tgg act cca gaa gaa gtg att ccc aag aga 1257

Phe Val Asp Pro Asp Ser Trp Thr Pro Glu Glu Val Ile Pro Lys Arg

390	395	400	
ttg caa gag aaa cag aag tca gaa cgg gaa aca gcc gta cgc atc tcc			1305
Leu Gln Glu Lys Gln Lys Ser Glu Arg Glu Thr Ala Val Arg Ile Ser			
405	410	415	
cag gag att ggg aac ctt atg aag gaa atc gag acc ctt gtg gaa gag			1353
Gln Glu Ile Gly Asn Leu Met Lys Glu Ile Glu Thr Leu Val Glu Glu			
420	425	430	
aag acc aag gag tca ctg gat gtg agc aga ctg acc cgg gaa ggt ggc			1401
Lys Thr Lys Glu Ser Leu Asp Val Ser Arg Leu Thr Arg Glu Gly Gly			
435	440	445	450
ccc ctg ctg tat gaa ggc atc agt ctc acc atg aac tcc aaa ctc ctg			1449
Pro Leu Leu Tyr Glu Gly Ile Ser Leu Thr Met Asn Ser Lys Leu Leu			
455	460	465	
aat ggt tac cag cgg gtg gtg atg gac ggc gta atc tct gac cac gag			1497
Asn Gly Tyr Gln Arg Val Val Met Asp Gly Val Ile Ser Asp His Glu			
470	475	480	
tgt cag gag ctg cag aga ctg acc aat gtg gca gca acc tca gga gat			1545
Cys Gln Glu Leu Gln Arg Leu Thr Asn Val Ala Ala Thr Ser Gly Asp			
485	490	495	
ggc tac cgg ggt cag acc tcc cca cat act ccc aat gaa aag ttc tat			1593
Gly Tyr Arg Gly Gln Thr Ser Pro His Thr Pro Asn Glu Lys Phe Tyr			
500	505	510	

ggt gtc act gtc ttc aaa gcc ctc aag ctg ggg caa gaa ggc aaa gtt 1641  
 Gly Val Thr Val Phe Lys Ala Leu Lys Leu Gly Gln Glu Gly Lys Val  
 515 520 525 530

cct ctg cag agt gcc cac ctg tac tac aac gtg acg gag aaa gtg cgg 1689  
 Pro Leu Gln Ser Ala His Leu Tyr Tyr Asn Val Thr Glu Lys Val Arg  
 535 540 545

cgc atc atg gag tcc tac ttc cgc ctg gat acg ccc ctc tac ttt tcc 1737  
 Arg Ile Met Glu Ser Tyr Phe Arg Leu Asp Thr Pro Leu Tyr Phe Ser  
 550 555 560

tac tct cat ctg gtg tgc cgc act gcc atc gaa gag gtc cag gca gag 1785  
 Tyr Ser His Leu Val Cys Arg Thr Ala Ile Glu Glu Val Gln Ala Glu  
 565 570 575

agg aag gat gat agt cat cca gtc cac gtg gac aac tgc atc ctg aat 1833  
 Arg Lys Asp Asp Ser His Pro Val His Val Asp Asn Cys Ile Leu Asn  
 580 585 590

gcc gag acc ctc gtg tgt gtc aaa gag ccc cca gcc tac acc ttc cgc 1881  
 Ala Glu Thr Leu Val Cys Val Lys Glu Pro Pro Ala Tyr Thr Phe Arg  
 595 600 605 610

gac tac agc gcc atc ctt tac cta aat ggg gac ttc gat ggc gga aac 1929  
 Asp Tyr Ser Ala Ile Leu Tyr Leu Asn Gly Asp Phe Asp Gly Gly Asn  
 615 620 625

ttt tat ttc act gaa ctg gat gcc aag acc gtg acg gca gag gtg cag 1977  
Phe Tyr Phe Thr Glu Leu Asp Ala Lys Thr Val Thr Ala Glu Val Gln

630

635

640

cct cag tgt gga aga gcc gtg gga ttc tct tca ggc act gaa aac cca 2025  
Pro Gln Cys Gly Arg Ala Val Gly Phe Ser Ser Gly Thr Glu Asn Pro

645

650

655

cat gga gtg aag gct gtc acc agg ggg cag cgc tgt gcc atc gcc ctg 2073  
His Gly Val Lys Ala Val Thr Arg Gly Gln Arg Cys Ala Ile Ala Leu

660

665

670

tgg ttc acc ctg gac cct cga cac agc gag cgg gac agg gtg cag gca 2121  
Trp Phe Thr Leu Asp Pro Arg His Ser Glu Arg Asp Arg Val Gln Ala

675

680

685

690

gat gac ctg gtg aag atg ctc ttc agc cca gaa gag atg gac ctc tcc 2169  
Asp Asp Leu Val Lys Met Leu Phe Ser Pro Glu Glu Met Asp Leu Ser

695

700

705

cag gag cag ccc ctg gat gcc cag cag ggc ccc ccc gaa cct gca caa 2217  
Gln Glu Gln Pro Leu Asp Ala Gln Gln Gly Pro Pro Glu Pro Ala Gln

710

715

720

gag tct ctc tca ggc agt gaa tcg aag ccc aag gat gag cta 2259  
Glu Ser Leu Ser Gly Ser Glu Ser Lys Pro Lys Asp Glu Leu

725

730

735

tgacagcgtc caggtcagac ggatgggtga ctagacccat gaagaggaac tcttcttgca 2319

ctctgagctg gccagcccct cggggctgca gagcagtgag cctacatctg ccactcagcc 2379

gaggggaccc tgctcacagc cttctacatg gtgctactgc tcttgagtg gacatgacca 2439

gacaccgcac cccctggatc tggctgaggg ctcaggacac aggcccagcc acccccaggg 2499

gcctccacag gccgctgcat aacagcgata cagtacttaa gtgtctgtgt agacaaccaa 2559

agaataaatg attcatgggt ttttttaaaa aaaaaaaaaa a 2600

<210> 4

<211> 736

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Val Arg Ala Leu Lys Leu Leu Thr Thr Leu Leu Ala Val Val

1 5 10 15

Ala Ala Ala Ser Gln Ala Glu Val Glu Ser Glu Ala Gly Trp Gly Met

20 25 30

Val Thr Pro Asp Leu Leu Phe Ala Glu Gly Thr Ala Ala Tyr Ala Arg

35 40 45

Gly Asp Trp Pro Gly Val Val Leu Ser Met Glu Arg Ala Leu Arg Ser

50 55 60

Arg Ala Ala Leu Arg Ala Leu Arg Leu Arg Cys Arg Thr Gln Cys Ala  
65 70 75 80

Ala Asp Phe Pro Trp Glu Leu Asp Pro Asp Trp Ser Pro Ser Pro Ala  
85 90 95

Gln Ala Ser Gly Ala Gly Ala Leu Arg Asp Leu Ser Phe Phe Gly Gly  
100 105 110

Leu Leu Arg Arg Ala Ala Cys Leu Arg Arg Cys Leu Gly Pro Pro Ala  
115 120 125

Ala His Ser Leu Ser Glu Glu Met Glu Leu Glu Phe Arg Lys Arg Ser  
130 135 140

Pro Tyr Asn Tyr Leu Gln Val Ala Tyr Phe Lys Ile Asn Lys Leu Glu  
145 150 155 160

Lys Ala Val Ala Ala Ala His Thr Phe Phe Val Gly Asn Pro Glu His  
165 170 175

Met Glu Met Gln Gln Asn Leu Asp Tyr Tyr Gln Thr Met Ser Gly Val  
180 185 190

Lys Glu Ala Asp Phe Lys Asp Leu Glu Thr Gln Pro His Met Gln Glu  
195 200 205

Phe Arg Leu Gly Val Arg Leu Tyr Ser Glu Glu Gln Pro Gln Glu Ala

210	215	220	
Val Pro His Leu Glu Ala Ala Leu Gln Glu Tyr Phe Val Ala Tyr Glu			
225	230	235	240
Glu Cys Arg Ala Leu Cys Glu Gly Pro Tyr Asp Tyr Asp Gly Tyr Asn			
245	250	255	
Tyr Leu Glu Tyr Asn Ala Asp Leu Phe Gln Ala Ile Thr Asp His Tyr			
260	265	270	
Ile Gln Val Leu Asn Cys Lys Gln Asn Cys Val Thr Glu Leu Ala Ser			
275	280	285	
His Pro Ser Arg Glu Lys Pro Phe Glu Asp Phe Leu Pro Ser His Tyr			
290	295	300	
Asn Tyr Leu Gln Phe Ala Tyr Tyr Asn Ile Gly Asn Tyr Thr Gln Ala			
305	310	315	320
Gly Glu Cys Ala Lys Thr Tyr Leu Leu Phe Phe Pro Asn Asp Glu Val			
325	330	335	
Met Asn Gln Asn Leu Ala Tyr Tyr Ala Ala Met Leu Gly Glu Glu His			
340	345	350	
Thr Arg Ser Ile Gly Pro Arg Glu Ser Ala Lys Glu Tyr Arg Gln Arg			
355	360	365	

Ser Leu Leu Glu Lys Glu Leu Leu Phe Phe Ala Tyr Asp Val Phe Gly

370

375

380

Ile Pro Phe Val Asp Pro Asp Ser Trp Thr Pro Glu Glu Val Ile Pro

385

390

395

400

Lys Arg Leu Gln Glu Lys Gln Lys Ser Glu Arg Glu Thr Ala Val Arg

405

410

415

Ile Ser Gln Glu Ile Gly Asn Leu Met Lys Glu Ile Glu Thr Leu Val

420

425

430

Glu Glu Lys Thr Lys Glu Ser Leu Asp Val Ser Arg Leu Thr Arg Glu

435

440

445

Gly Gly Pro Leu Leu Tyr Glu Gly Ile Ser Leu Thr Met Asn Ser Lys

450

455

460

Leu Leu Asn Gly Tyr Gln Arg Val Val Met Asp Gly Val Ile Ser Asp

465

470

475

480

His Glu Cys Gln Glu Leu Gln Arg Leu Thr Asn Val Ala Ala Thr Ser

485

490

495

Gly Asp Gly Tyr Arg Gly Gln Thr Ser Pro His Thr Pro Asn Glu Lys

500

505

510

Phe Tyr Gly Val Thr Val Phe Lys Ala Leu Lys Leu Gly Gln Glu Gly

515

520

525

Lys Val Pro Leu Gln Ser Ala His Leu Tyr Tyr Asn Val Thr Glu Lys

530

535

540

Val Arg Arg Ile Met Glu Ser Tyr Phe Arg Leu Asp Thr Pro Leu Tyr

545

550

555

560

Phe Ser Tyr Ser His Leu Val Cys Arg Thr Ala Ile Glu Glu Val Gln

565

570

575

Ala Glu Arg Lys Asp Asp Ser His Pro Val His Val Asp Asn Cys Ile

580

585

590

Leu Asn Ala Glu Thr Leu Val Cys Val Lys Glu Pro Pro Ala Tyr Thr

595

600

605

Phe Arg Asp Tyr Ser Ala Ile Leu Tyr Leu Asn Gly Asp Phe Asp Gly

610

615

620

Gly Asn Phe Tyr Phe Thr Glu Leu Asp Ala Lys Thr Val Thr Ala Glu

625

630

635

640

Val Gln Pro Gln Cys Gly Arg Ala Val Gly Phe Ser Ser Gly Thr Glu

645

650

655

Asn Pro His Gly Val Lys Ala Val Thr Arg Gly Gln Arg Cys Ala Ile

660

665

670

Ala Leu Trp Phe Thr Leu Asp Pro Arg His Ser Glu Arg Asp Arg Val

675

680

685

Gln Ala Asp Asp Leu Val Lys Met Leu Phe Ser Pro Glu Glu Met Asp

690

695

700

Leu Ser Gln Glu Gln Pro Leu Asp Ala Gln Gln Gly Pro Pro Glu Pro

705

710

715

720

Ala Gln Glu Ser Leu Ser Gly Ser Glu Ser Lys Pro Lys Asp Glu Leu

725

730

735

<210> 5

<211> 2416

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(2252)

<400> 5

ggagcaaggc c atg gcg gtg acg aaa gga ggc tgc tgg cac gat gct agc 50

Met Ala Val Thr Lys Gly Gly Cys Trp His Asp Ala Ser

1

5

10

ggt cgc cgc cgc cgc cgc ctt acg ggt tgc ggc gag tct gag ccg gga 98

Gly Arg Arg Arg Arg Arg Leu Thr Gly Cys Gly Glu Ser Glu Pro Gly

15

20

25

tgg gac gtg gca gcc cct gac ctg ctt tac gca gag ggg acc gcg gcc 146  
 Trp Asp Val Ala Ala Pro Asp Leu Leu Tyr Ala Glu Gly Thr Ala Ala  
 30 35 40 45

tac tcg cgc agg gac tgg ccc ggg gtg gtc ctg aac atg gag cgg gct 194  
 Tyr Ser Arg Arg Asp Trp Pro Gly Val Val Leu Asn Met Glu Arg Ala  
 50 55 60

ctg cgc tcg cgg gcg gcc ctg cgt gcc ctc cgc ctg cgc tgc cgc aca 242  
 Leu Arg Ser Arg Ala Ala Leu Arg Ala Leu Arg Leu Arg Cys Arg Thr  
 65 70 75

cgc tgt gcc acc gaa ctg ccg tgg gca ccg gac ctg gat ctc ggt ccg 290  
 Arg Cys Ala Thr Glu Leu Pro Trp Ala Pro Asp Leu Asp Leu Gly Pro  
 80 85 90

gac ccc agc ctg agc cag gac ccg ggc gcc gcc gcc ctg cac gac ctg 338  
 Asp Pro Ser Leu Ser Gln Asp Pro Gly Ala Ala Ala Leu His Asp Leu  
 95 100 105

cgc ttc ttc gga gcc gtg ctg cgc cgt gcc gcc tgc cta cgc cgc tgc 386  
 Arg Phe Phe Gly Ala Val Leu Arg Arg Ala Ala Cys Leu Arg Arg Cys  
 110 115 120 125

ctc ggg ccg ccc tct gcc cac ttg ctg agt gaa gaa ctg gac ctg gag 434  
 Leu Gly Pro Pro Ser Ala His Leu Leu Ser Glu Glu Leu Asp Leu Glu  
 130 135 140

ttc aac aag cgg agc ccg tac aac tac ctg cag gtc gcc tat ttc aag	482
Phe Asn Lys Arg Ser Pro Tyr Asn Tyr Leu Gln Val Ala Tyr Phe Lys	
145 150 155	
ata aac aag ctg gag aaa gct gtg gct gcg gca cac acc ttc ttt gtg	530
Ile Asn Lys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Ala His Thr Phe Phe Val	
160 165 170	
ggc aat cct gag cac atg gag atg cgg cag aac ctc gac tat tac caa	578
Gly Asn Pro Glu His Met Glu Met Arg Gln Asn Leu Asp Tyr Tyr Gln	
175 180 185	
acc atg tct ggg gtg aag gag gca gac ttc agg gat ctc gag gcc aag	626
Thr Met Ser Gly Val Lys Glu Ala Asp Phe Arg Asp Leu Glu Ala Lys	
190 195 200 205	
ccc cat atg cat gag ttt cgg ctg ggg gta cga ctc tac tca gag gag	674
Pro His Met His Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Leu Tyr Ser Glu Glu	
210 215 220	
aag cca cag gaa gct gtg ccc cac ctg gag gcg gca ctg caa gag tac	722
Lys Pro Gln Glu Ala Val Pro His Leu Glu Ala Ala Leu Gln Glu Tyr	
225 230 235	
ttt gtg gcc gat gag gag tgc cgt gcc ctc tgc gaa ggg ccc tat gac	770
Phe Val Ala Asp Glu Glu Cys Arg Ala Leu Cys Glu Gly Pro Tyr Asp	
240 245 250	
tac gac ggc tac aac tac cta gac tac agc gct gac ctc ttc cag gcc	818

Tyr Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Asp Leu Phe Gln Ala	
255	260
265	
atc aca gat cat tac gtc cag gtc ctc aac tgt aag cag aac tgt gtc	866
Ile Thr Asp His Tyr Val Gln Val Leu Asn Cys Lys Gln Asn Cys Val	
270	275
280	285
acg gag ctg gct tcc cac cca agt agg gaa aag ccc ttt gaa gac ttc	914
Thr Glu Leu Ala Ser His Pro Ser Arg Glu Lys Pro Phe Glu Asp Phe	
290	295
300	
ctc cct tca cac tat aat tac cta cag ttt gcc tac tac aac att ggg	962
Leu Pro Ser His Tyr Asn Tyr Leu Gln Phe Ala Tyr Tyr Asn Ile Gly	
305	310
315	
aac tat aca caa gct att gaa tgt gcc aag acc tac ctc ctc ttc ttt	1010
Asn Tyr Thr Gln Ala Ile Glu Cys Ala Lys Thr Tyr Leu Leu Phe Phe	
320	325
330	
ccc aat gat gag gtg atg cac cag aat ctg gct tat tac aca gcc atg	1058
Pro Asn Asp Glu Val Met His Gln Asn Leu Ala Tyr Tyr Thr Ala Met	
335	340
345	
ctt gga gaa gaa gag gcc agc tcc atc agc ccc agg gag aat gcc gag	1106
Leu Gly Glu Glu Glu Ala Ser Ser Ile Ser Pro Arg Glu Asn Ala Glu	
350	355
360	365
gaa tac cga cgt cca aac ctg ttg gag aaa gaa ctg ctt ttc ttc gct	1154
Glu Tyr Arg Arg Pro Asn Leu Leu Glu Lys Glu Leu Leu Phe Phe Ala	

370	375	380	
tat gac att ttt gga att ccc ttt gtg gat ccc gat tca tgg act cca			1202
Tyr Asp Ile Phe Gly Ile Pro Phe Val Asp Pro Asp Ser Trp Thr Pro			
385	390	395	
gaa gaa gtg att ccc aag aga ttg caa gag aaa cag aag tct gaa cgg			1250
Glu Glu Val Ile Pro Lys Arg Leu Gln Glu Lys Gln Lys Ser Glu Arg			
400	405	410	
gaa aca gcc gta cgc atc tcc cag gag att ggg aac ctt atg aag gaa			1298
Glu Thr Ala Val Arg Ile Ser Gln Glu Ile Gly Asn Leu Met Lys Glu			
415	420	425	
atc gag acc ctt gtg gaa gag aag acc aag gag tct ctg gat gtg agc			1346
Ile Glu Thr Leu Val Glu Glu Lys Thr Lys Glu Ser Leu Asp Val Ser			
430	435	440	445
aga ctg acc cgg gaa ggt ggt ccc ctg ctg tat gaa ggc atc agt ctc			1394
Arg Leu Thr Arg Glu Gly Gly Pro Leu Leu Tyr Glu Gly Ile Ser Leu			
450	455	460	
acc atg aac tcc aaa gtc ttg aat ggc tcc cag cgg gtg gtg atg gat			1442
Thr Met Asn Ser Lys Val Leu Asn Gly Ser Gln Arg Val Val Met Asp			
465	470	475	
ggt gtg atc tct gat gat gag tgc cag gag ctg cag aga ctg acc aat			1490
Gly Val Ile Ser Asp Asp Glu Cys Gln Glu Leu Gln Arg Leu Thr Asn			
480	485	490	

gcg gca gca act tcg gga gat ggc tac cga ggt cag acc tcc cca cac	1538
Ala Ala Ala Thr Ser Gly Asp Gly Tyr Arg Gly Gln Thr Ser Pro His	
495 500 505	
acc cca aat gaa aag ttc tat ggt gtt act gtc ctc aaa gct ctc aag	1586
Thr Pro Asn Glu Lys Phe Tyr Gly Val Thr Val Leu Lys Ala Leu Lys	
510 515 520 525	
ctc ggg cag gaa gga aaa gtt cct ctg cag agt gcc cgc atg tac tac	1634
Leu Gly Gln Glu Gly Lys Val Pro Leu Gln Ser Ala Arg Met Tyr Tyr	
530 535 540	
aac gtg aca gag aag gtg cgg cgc gtc atg gag tcc tac ttc cgc ctg	1682
Asn Val Thr Glu Lys Val Arg Arg Val Met Glu Ser Tyr Phe Arg Leu	
545 550 555	
gac acg ccc ctc tat ttc tct tat tcc cac ttc gtg tgc cgc act gca	1730
Asp Thr Pro Leu Tyr Phe Ser Tyr Ser His Phe Val Cys Arg Thr Ala	
560 565 570	
ata gaa gag tca cag gct gag agg aag gac agt agc cac ccc gtc cac	1778
Ile Glu Glu Ser Gln Ala Glu Arg Lys Asp Ser Ser His Pro Val His	
575 580 585	
gtg gat aac tgc atc ctg aat gcc gaa gcc ttc atg tgt atc aag gag	1826
Val Asp Asn Cys Ile Leu Asn Ala Glu Ala Phe Met Cys Ile Lys Glu	
590 595 600 605	

ccc cca gca tac acg ttc cgg gaa tac agc gcc atc ctt tac ctc aat	1874
Pro Pro Ala Tyr Thr Phe Arg Glu Tyr Ser Ala Ile Leu Tyr Leu Asn	
610 615 620	
ggc gac ttc gat gga gga aac ttt tac ttc aca gaa cta gat gcc aag	1922
Gly Asp Phe Asp Gly Gly Asn Phe Tyr Phe Thr Glu Leu Asp Ala Lys	
625 630 635	
act gtg acg gca gag gtg cag ccc cag tgt gga agg gct gtg gga ttc	1970
Thr Val Thr Ala Glu Val Gln Pro Gln Cys Gly Arg Ala Val Gly Phe	
640 645 650	
tct tct ggc act gag aac cca cat gga gtg aag gct gtc acc agg ggg	2018
Ser Ser Gly Thr Glu Asn Pro His Gly Val Lys Ala Val Thr Arg Gly	
655 660 665	
cag cgc tgc gcc atc gcc ctg tgg ttc acg ctg gat cct cgg cac agt	2066
Gln Arg Cys Ala Ile Ala Leu Trp Phe Thr Leu Asp Pro Arg His Ser	
670 675 680 685	
gag aga gac agg gtg cag gca gat gac ctg gtg aag atg ctg ttc agc	2114
Glu Arg Asp Arg Val Gln Ala Asp Asp Leu Val Lys Met Leu Phe Ser	
690 695 700	
cca gaa gag gtg gac ctc ccc cag gaa cag ccc ctg cct gac cag cag	2162
Pro Glu Glu Val Asp Leu Pro Gln Glu Gln Pro Leu Pro Asp Gln Gln	
705 710 715	
ggt tcg cca gag cct gga gaa gag ttt ctg cat ggt gct act gtt ctt	2210

Gly Ser Pro Glu Pro Gly Glu Glu Phe Leu His Gly Ala Thr Val Leu

720

725

730

gga gtg ggc ata gca gga cac act ctt ctc tgg gct tgg ctg 2252

Gly Val Gly Ile Ala Gly His Thr Leu Leu Trp Ala Trp Leu

735

740

745

taggctcaga atgcaggccc agaaccaccc tggggcctat gtaggcagct gccgtcagca 2312

gcgtgatata tttaagtgtc tgtaaagaca accaaagaat aaatgatttg tgtttttaaa 2372

aagnaaaaaa aaaaaaaaaat taaaaatttg cgcggccgca agaa 2416

<210> 6

<211> 747

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 6

Met Ala Val Thr Lys Gly Gly Cys Trp His Asp Ala Ser Gly Arg Arg

1

5

10

15

Arg Arg Arg Leu Thr Gly Cys Gly Glu Ser Glu Pro Gly Trp Asp Val

20

25

30

Ala Ala Pro Asp Leu Leu Tyr Ala Glu Gly Thr Ala Ala Tyr Ser Arg

35

40

45

Arg Asp Trp Pro Gly Val Val Leu Asn Met Glu Arg Ala Leu Arg Ser  
50 55 60

Arg Ala Ala Leu Arg Ala Leu Arg Leu Arg Cys Arg Thr Arg Cys Ala  
65 70 75 80

Thr Glu Leu Pro Trp Ala Pro Asp Leu Asp Leu Gly Pro Asp Pro Ser  
85 90 95

Leu Ser Gln Asp Pro Gly Ala Ala Ala Leu His Asp Leu Arg Phe Phe  
100 105 110

Gly Ala Val Leu Arg Arg Ala Ala Cys Leu Arg Arg Cys Leu Gly Pro  
115 120 125

Pro Ser Ala His Leu Leu Ser Glu Glu Leu Asp Leu Glu Phe Asn Lys  
130 135 140

Arg Ser Pro Tyr Asn Tyr Leu Gln Val Ala Tyr Phe Lys Ile Asn Lys  
145 150 155 160

Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Ala His Thr Phe Phe Val Gly Asn Pro  
165 170 175

Glu His Met Glu Met Arg Gln Asn Leu Asp Tyr Tyr Gln Thr Met Ser  
180 185 190

Gly Val Lys Glu Ala Asp Phe Arg Asp Leu Glu Ala Lys Pro His Met  
195 200 205

His Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Leu Tyr Ser Glu Glu Lys Pro Gln  
210 215 220

Glu Ala Val Pro His Leu Glu Ala Ala Leu Gln Glu Tyr Phe Val Ala  
225 230 235 240

Asp Glu Glu Cys Arg Ala Leu Cys Glu Gly Pro Tyr Asp Tyr Asp Gly  
245 250 255

Tyr Asn Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Asp Leu Phe Gln Ala Ile Thr Asp  
260 265 270

His Tyr Val Gln Val Leu Asn Cys Lys Gln Asn Cys Val Thr Glu Leu  
275 280 285

Ala Ser His Pro Ser Arg Glu Lys Pro Phe Glu Asp Phe Leu Pro Ser  
290 295 300

His Tyr Asn Tyr Leu Gln Phe Ala Tyr Tyr Asn Ile Gly Asn Tyr Thr  
305 310 315 320

Gln Ala Ile Glu Cys Ala Lys Thr Tyr Leu Leu Phe Phe Pro Asn Asp  
325 330 335

Glu Val Met His Gln Asn Leu Ala Tyr Tyr Thr Ala Met Leu Gly Glu  
340 345 350

Glu Glu Ala Ser Ser Ile Ser Pro Arg Glu Asn Ala Glu Glu Tyr Arg

355

360

365

Arg Pro Asn Leu Leu Glu Lys Glu Leu Leu Phe Phe Ala Tyr Asp Ile

370

375

380

Phe Gly Ile Pro Phe Val Asp Pro Asp Ser Trp Thr Pro Glu Glu Val

385

390

395

400

Ile Pro Lys Arg Leu Gln Glu Lys Gln Lys Ser Glu Arg Glu Thr Ala

405

410

415

Val Arg Ile Ser Gln Glu Ile Gly Asn Leu Met Lys Glu Ile Glu Thr

420

425

430

Leu Val Glu Glu Lys Thr Lys Glu Ser Leu Asp Val Ser Arg Leu Thr

435

440

445

Arg Glu Gly Gly Pro Leu Leu Tyr Glu Gly Ile Ser Leu Thr Met Asn

450

455

460

Ser Lys Val Leu Asn Gly Ser Gln Arg Val Val Met Asp Gly Val Ile

465

470

475

480

Ser Asp Asp Glu Cys Gln Glu Leu Gln Arg Leu Thr Asn Ala Ala Ala

485

490

495

Thr Ser Gly Asp Gly Tyr Arg Gly Gln Thr Ser Pro His Thr Pro Asn

500

505

510

Glu Lys Phe Tyr Gly Val Thr Val Leu Lys Ala Leu Lys Leu Gly Gln

515

520

525

Glu Gly Lys Val Pro Leu Gln Ser Ala Arg Met Tyr Tyr Asn Val Thr

530

535

540

Glu Lys Val Arg Arg Val Met Glu Ser Tyr Phe Arg Leu Asp Thr Pro

545

550

555

560

Leu Tyr Phe Ser Tyr Ser His Phe Val Cys Arg Thr Ala Ile Glu Glu

565

570

575

Ser Gln Ala Glu Arg Lys Asp Ser Ser His Pro Val His Val Asp Asn

580

585

590

Cys Ile Leu Asn Ala Glu Ala Phe Met Cys Ile Lys Glu Pro Pro Ala

595

600

605

Tyr Thr Phe Arg Glu Tyr Ser Ala Ile Leu Tyr Leu Asn Gly Asp Phe

610

615

620

Asp Gly Gly Asn Phe Tyr Phe Thr Glu Leu Asp Ala Lys Thr Val Thr

625

630

635

640

Ala Glu Val Gln Pro Gln Cys Gly Arg Ala Val Gly Phe Ser Ser Gly

645

650

655

Thr Glu Asn Pro His Gly Val Lys Ala Val Thr Arg Gly Gln Arg Cys

660

665

670

Ala Ile Ala Leu Trp Phe Thr Leu Asp Pro Arg His Ser Glu Arg Asp

675

680

685

Arg Val Gln Ala Asp Asp Leu Val Lys Met Leu Phe Ser Pro Glu Glu

690

695

700

Val Asp Leu Pro Gln Glu Gln Pro Leu Pro Asp Gln Gln Gly Ser Pro

705

710

715

720

Glu Pro Gly Glu Glu Phe Leu His Gly Ala Thr Val Leu Gly Val Gly

725

730

735

Ile Ala Gly His Thr Leu Leu Trp Ala Trp Leu

740

745

<210> 7

<211> 2322

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (12)..(1637)

<400> 7

ggagcaaggc c atg gcg gtg acg aaa gga ggc tgc tgg cac gat gct agc 50

Met Ala Val Thr Lys Gly Gly Cys Trp His Asp Ala Ser

1

5

10

ggt cgc cgc cgc cgc cgc ctt acg ggt tgc ggc gag tct gag ccg gga 98

Gly Arg Arg Arg Arg Arg Leu Thr Gly Cys Gly Glu Ser Glu Pro Gly

15

20

25

tgg gac gtg gca gcc cct gac ctg ctt tac gca gag ggg acc gcg gcc 146

Trp Asp Val Ala Ala Pro Asp Leu Leu Tyr Ala Glu Gly Thr Ala Ala

30

35

40

45

tac tcg cgc agg gac tgg ccc ggg gtg gtc ctg aac atg gag cgg gct 194

Tyr Ser Arg Arg Asp Trp Pro Gly Val Val Leu Asn Met Glu Arg Ala

50

55

60

ctg cgc tcg cgg gcg gcc ctg cgt gcc ctc cgc ctg cgc tgc cgc aca 242

Leu Arg Ser Arg Ala Ala Leu Arg Ala Leu Arg Leu Arg Cys Arg Thr

65

70

75

cgc tgt gcc acc gaa ctg ccg tgg gca ccg gac ctg gat ctc ggt ccg 290

Arg Cys Ala Thr Glu Leu Pro Trp Ala Pro Asp Leu Asp Leu Gly Pro

80

85

90

gac ccc agc ctg agc cag gac ccg ggc gcc gcc gcc ctg cac gac ctg 338

Asp Pro Ser Leu Ser Gln Asp Pro Gly Ala Ala Ala Leu His Asp Leu

95

100

105

cgc ttc ttc gga gcc gtg ctg cgc cgt gcc gcc tgc cta cgc cgc tgc 386

Arg Phe Phe Gly Ala Val Leu Arg Arg Ala Ala Cys Leu Arg Arg Cys

110

115

120

125

ctc ggg ccg ccc tct gcc cac ttg ctg agt gaa gaa ctg gac ctg gag 434

Leu Gly Pro Pro Ser Ala His Leu Leu Ser Glu Glu Leu Asp Leu Glu

130

135

140

ttc aac aag cgg agc ccg tac aac tac ctg cag gtc gcc tat ttc aag 482

Phe Asn Lys Arg Ser Pro Tyr Asn Tyr Leu Gln Val Ala Tyr Phe Lys

145

150

155

ata aac aag ctg gag aaa gct gtg gct gcg gca cac acc ttc ttt gtg 530

Ile Asn Lys Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Ala His Thr Phe Phe Val

160

165

170

ggc aat cct gag cac atg gag atg cgg cag aac ctc gac tat tac caa 578

Gly Asn Pro Glu His Met Glu Met Arg Gln Asn Leu Asp Tyr Tyr Gln

175

180

185

acc atg tct ggg gtg aag gag gca gac ttc agg gat ctc gag gcc aag 626

Thr Met Ser Gly Val Lys Glu Ala Asp Phe Arg Asp Leu Glu Ala Lys

190

195

200

205

ccc cat atg cat gag ttt cgg ctg ggg gta cga ctc tac tca gag gag 674

Pro His Met His Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Leu Tyr Ser Glu Glu

210

215

220

aag cca cag gaa gct gtg ccc cac ctg gag gcg gca ctg caa gag tac 722

Lys Pro Gln Glu Ala Val Pro His Leu Glu Ala Ala Leu Gln Glu Tyr

225

230

235

ttt gtg gcc gat gag gag tgc cgt gcc ctc tgc gaa ggg ccc tat gac 770

Phe Val Ala Asp Glu Glu Cys Arg Ala Leu Cys Glu Gly Pro Tyr Asp

240

245

250

tac gac ggc tac aac tac cta gac tac agc gct gac ctc ttc cag gcc 818

Tyr Asp Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Asp Leu Phe Gln Ala

255

260

265

atc aca gat cat tac gtc cag gtc ctc aac tgt aag cag aac tgt gtc 866

Ile Thr Asp His Tyr Val Gln Val Leu Asn Cys Lys Gln Asn Cys Val

270

275

280

285

acg gag ctg gct tcc cac cca agt agg gaa aag ccc ttt gaa gac ttc 914

Thr Glu Leu Ala Ser His Pro Ser Arg Glu Lys Pro Phe Glu Asp Phe

290

295

300

ctc cct tca cac tat aat tac cta cag ttt gcc tac tac aac att ggg 962

Leu Pro Ser His Tyr Asn Tyr Leu Gln Phe Ala Tyr Tyr Asn Ile Gly

305

310

315

aac tat aca caa gct att gaa tgt gcc aag acc tac ctc ctc ttc ttt 1010

Asn Tyr Thr Gln Ala Ile Glu Cys Ala Lys Thr Tyr Leu Leu Phe Phe

320

325

330

ccc aat gat gag gtg atg cac cag aat ctg gct tat tac aca gcc atg 1058

Pro Asn Asp Glu Val Met His Gln Asn Leu Ala Tyr Tyr Thr Ala Met

335

340

345

ctt gga gaa gaa gag gcc agc tcc atc agc ccc agg gag aat gcc gag 1106

465

470

475

ggt gtg atc tct gat gat gag tgc cag gag ctg cag aga ctg acc aat 1490

Gly Val Ile Ser Asp Asp Glu Cys Gln Glu Leu Gln Arg Leu Thr Asn

480

485

490

gcg gca gca act tcg gga gat ggc tac cga ggt cag acc tcc cca cac 1538

Ala Ala Ala Thr Ser Gly Asp Gly Tyr Arg Gly Gln Thr Ser Pro His

495

500

505

acc cca aat gaa aag ttc tat ggt gtt act gtc ctc aaa gct ctc aag 1586

Thr Pro Asn Glu Lys Phe Tyr Gly Val Thr Val Leu Lys Ala Leu Lys

510

515

520

525

ctc ggg cag gaa gga aaa gtt cct ctg cag agt gcc cgc acc gca ctg 1634

Leu Gly Gln Glu Gly Lys Val Pro Leu Gln Ser Ala Arg Thr Ala Leu

530

535

540

caa tagaagagtc acaggctgag aggaaggaca gtagccaccc cgtccacgtg 1687

Gln

gataactgca tcctgaatgc cgaagccttc atgtgtatca aggagcccc agcatacacg 1747

ttccgggaat acagcgccat cctttacctc aatggcgact tcgatggagg aaacttttac 1807

ttcacagaac tagatgccaa gactgtgacg gcagaggtgc agccccagtg tggaagggt 1867

gtgggattct cttctggcac tgagaaccca catggagtga aggctgtcac cagggggcag 1927

cgctgcgcca tcgccctgtg gttcacgctg gatcctcggc acagtgagag agacagggtg 1987

caggcagatg acctggtgaa gatgctgttc agcccagaag aggtggacct cccccaggaa 2047

cagccccctgc ctgaccagca gggttcgcca gagcctggag aagagtttct gcatggtgct 2107

actgttcttg gagtgggcat agcaggacac actcttctct gggcttggt gtaggctcag 2167

aatgcaggcc cagaaccacc ctggggccta ttaggcagc tgccgtcagc agcgtgatat 2227

atttaagtgt ctgtaaagac aaccaaagaa taaatgattt gtgtttttaa aaagnaaaaa 2287

aaaaaaaaa ttaaaaattt gcgcggccgc aagaa 2322

<210> 8

<211> 542

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Ala Val Thr Lys Gly Gly Cys Trp His Asp Ala Ser Gly Arg Arg

1

5

10

15

Arg Arg Arg Leu Thr Gly Cys Gly Glu Ser Glu Pro Gly Trp Asp Val

20

25

30

Ala Ala Pro Asp Leu Leu Tyr Ala Glu Gly Thr Ala Ala Tyr Ser Arg

35

40

45

Arg Asp Trp Pro Gly Val Val Leu Asn Met Glu Arg Ala Leu Arg Ser  
50 55 60

Arg Ala Ala Leu Arg Ala Leu Arg Leu Arg Cys Arg Thr Arg Cys Ala  
65 70 75 80

Thr Glu Leu Pro Trp Ala Pro Asp Leu Asp Leu Gly Pro Asp Pro Ser  
85 90 95

Leu Ser Gln Asp Pro Gly Ala Ala Ala Leu His Asp Leu Arg Phe Phe  
100 105 110

Gly Ala Val Leu Arg Arg Ala Ala Cys Leu Arg Arg Cys Leu Gly Pro  
115 120 125

Pro Ser Ala His Leu Leu Ser Glu Glu Leu Asp Leu Glu Phe Asn Lys  
130 135 140

Arg Ser Pro Tyr Asn Tyr Leu Gln Val Ala Tyr Phe Lys Ile Asn Lys  
145 150 155 160

Leu Glu Lys Ala Val Ala Ala Ala His Thr Phe Phe Val Gly Asn Pro  
165 170 175

Glu His Met Glu Met Arg Gln Asn Leu Asp Tyr Tyr Gln Thr Met Ser  
180 185 190

Gly Val Lys Glu Ala Asp Phe Arg Asp Leu Glu Ala Lys Pro His Met

195

200

205

His Glu Phe Arg Leu Gly Val Arg Leu Tyr Ser Glu Glu Lys Pro Gln

210

215

220

Glu Ala Val Pro His Leu Glu Ala Ala Leu Gln Glu Tyr Phe Val Ala

225

230

235

240

Asp Glu Glu Cys Arg Ala Leu Cys Glu Gly Pro Tyr Asp Tyr Asp Gly

245

250

255

Tyr Asn Tyr Leu Asp Tyr Ser Ala Asp Leu Phe Gln Ala Ile Thr Asp

260

265

270

His Tyr Val Gln Val Leu Asn Cys Lys Gln Asn Cys Val Thr Glu Leu

275

280

285

Ala Ser His Pro Ser Arg Glu Lys Pro Phe Glu Asp Phe Leu Pro Ser

290

295

300

His Tyr Asn Tyr Leu Gln Phe Ala Tyr Tyr Asn Ile Gly Asn Tyr Thr

305

310

315

320

Gln Ala Ile Glu Cys Ala Lys Thr Tyr Leu Leu Phe Phe Pro Asn Asp

325

330

335

Glu Val Met His Gln Asn Leu Ala Tyr Tyr Thr Ala Met Leu Gly Glu

340

345

350

Glu Glu Ala Ser Ser Ile Ser Pro Arg Glu Asn Ala Glu Glu Tyr Arg  
355 360 365

Arg Pro Asn Leu Leu Glu Lys Glu Leu Leu Phe Phe Ala Tyr Asp Ile  
370 375 380

Phe Gly Ile Pro Phe Val Asp Pro Asp Ser Trp Thr Pro Glu Glu Val  
385 390 395 400

Ile Pro Lys Arg Leu Gln Glu Lys Gln Lys Ser Glu Arg Glu Thr Ala  
405 410 415

Val Arg Ile Ser Gln Glu Ile Gly Asn Leu Met Lys Glu Ile Glu Thr  
420 425 430

Leu Val Glu Glu Lys Thr Lys Glu Ser Leu Asp Val Ser Arg Leu Thr  
435 440 445

Arg Glu Gly Gly Pro Leu Leu Tyr Glu Gly Ile Ser Leu Thr Met Asn  
450 455 460

Ser Lys Val Leu Asn Gly Ser Gln Arg Val Val Met Asp Gly Val Ile  
465 470 475 480

Ser Asp Asp Glu Cys Gln Glu Leu Gln Arg Leu Thr Asn Ala Ala Ala  
485 490 495

Thr Ser Gly Asp Gly Tyr Arg Gly Gln Thr Ser Pro His Thr Pro Asn  
500 505 510

Glu Lys Phe Tyr Gly Val Thr Val Leu Lys Ala Leu Lys Leu Gly Gln

515

520

525

Glu Gly Lys Val Pro Leu Gln Ser Ala Arg Thr Ala Leu Gln

530

535

540

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

ggatccaagg agcgggctct gcgctcgc

19

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

ccaagcttgg ctgtgtaata a

21

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

tcattacatc caggtcctc

19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

tttggagttc atggtgagac

20

<210> 13

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

agatctagat ctatggcggg acgcgcgttg aagctgct

38

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

gtcgacgtcg acttcatagc tcaccttgg gcttcgatt

39

<210> 15

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

gtcgacgtcg actctaggtg ccctgctcac gggggccgat

40

【図面の簡単な説明】

【図 1】

マウスGros1シーケンスとESTシーケンスのアライメントを示す図である。

【図 2】

マウスGros1 cDNAのスプライシングフォームを示す図である。

【図 3】

ヒトGros1 cDNAのスプライシングフォームを示す図である。

【図 4】

マウスGros1 cDNAプローブを用いた、マウス組織ノーザン解析の結果を示す図である。

【図 5】

マウスGros1 cDNAプローブを用いた、ヒト細胞ノーザン解析の結果を示す図である。

【図 6】

マウスGros1 cDNAプローブを用いた、ヒト組織ノーザン解析の結果を示す図である。

【図 7】

COS7に発現させたヒトGFP-Gros1LとGFP-Gros1Sのウェスタン解析の結果を示す

図である。

【図 8】

ヒトGFP-Gros1LとヒトGFP-Gros1Sの細胞内での局在性を示す図である。

【図 9】

マウスGros1L、Gros1ミュータント、およびGros1アンチセンスを遺伝子導入したNIH3T3細胞のノーザン解析の結果を示す図である。

【図 1 0】

マウスGros1L、Gros1ミュータント、およびGros1アンチセンスを遺伝子導入したNIH3T3細胞のコロニー形成能の解析結果を示す図である。

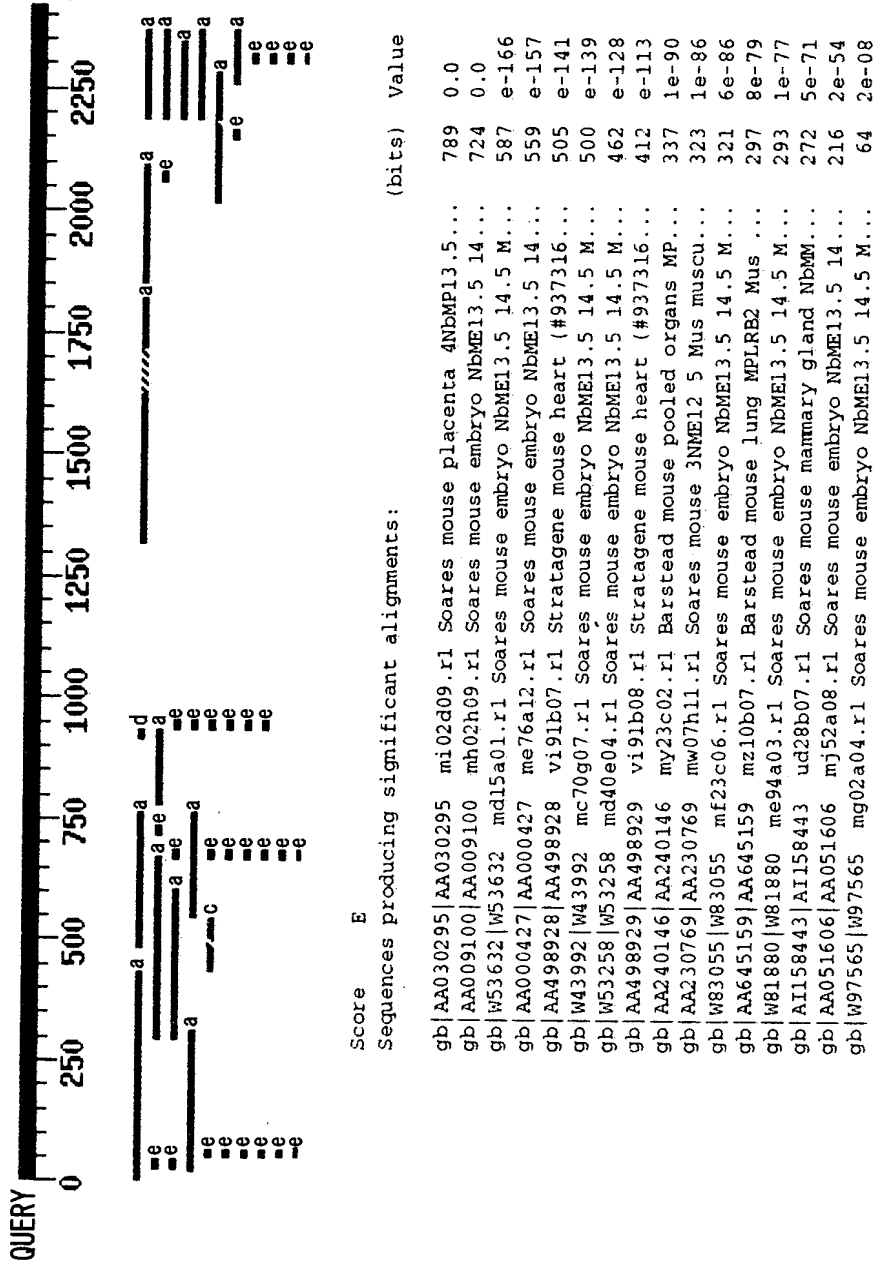
【書類名】

図面

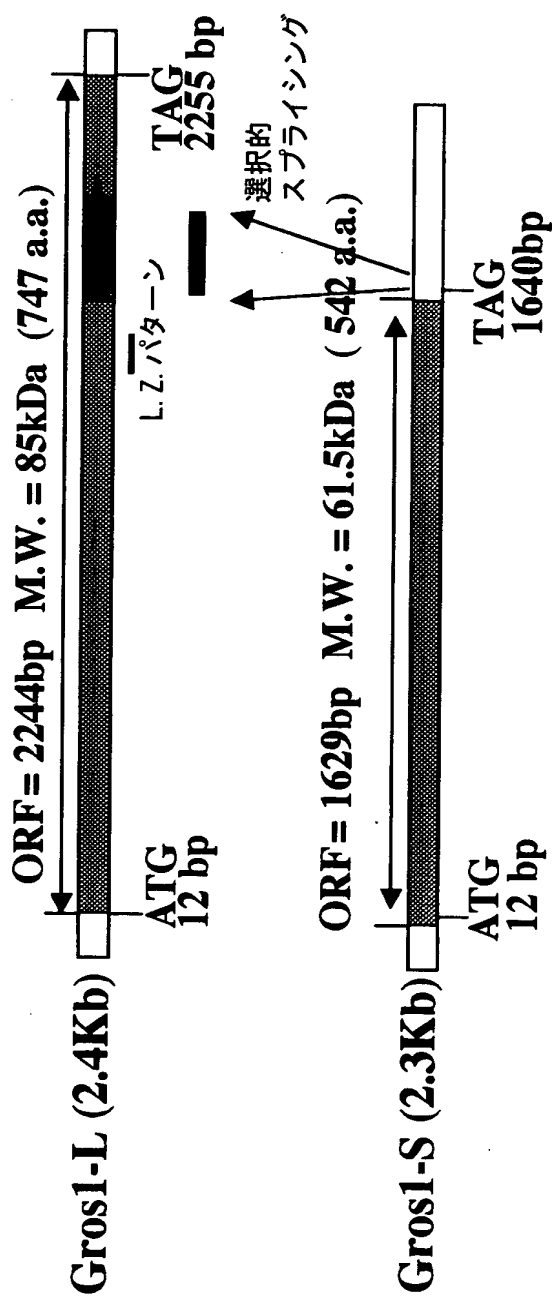
【図 1】

# マウス#7 ESTs

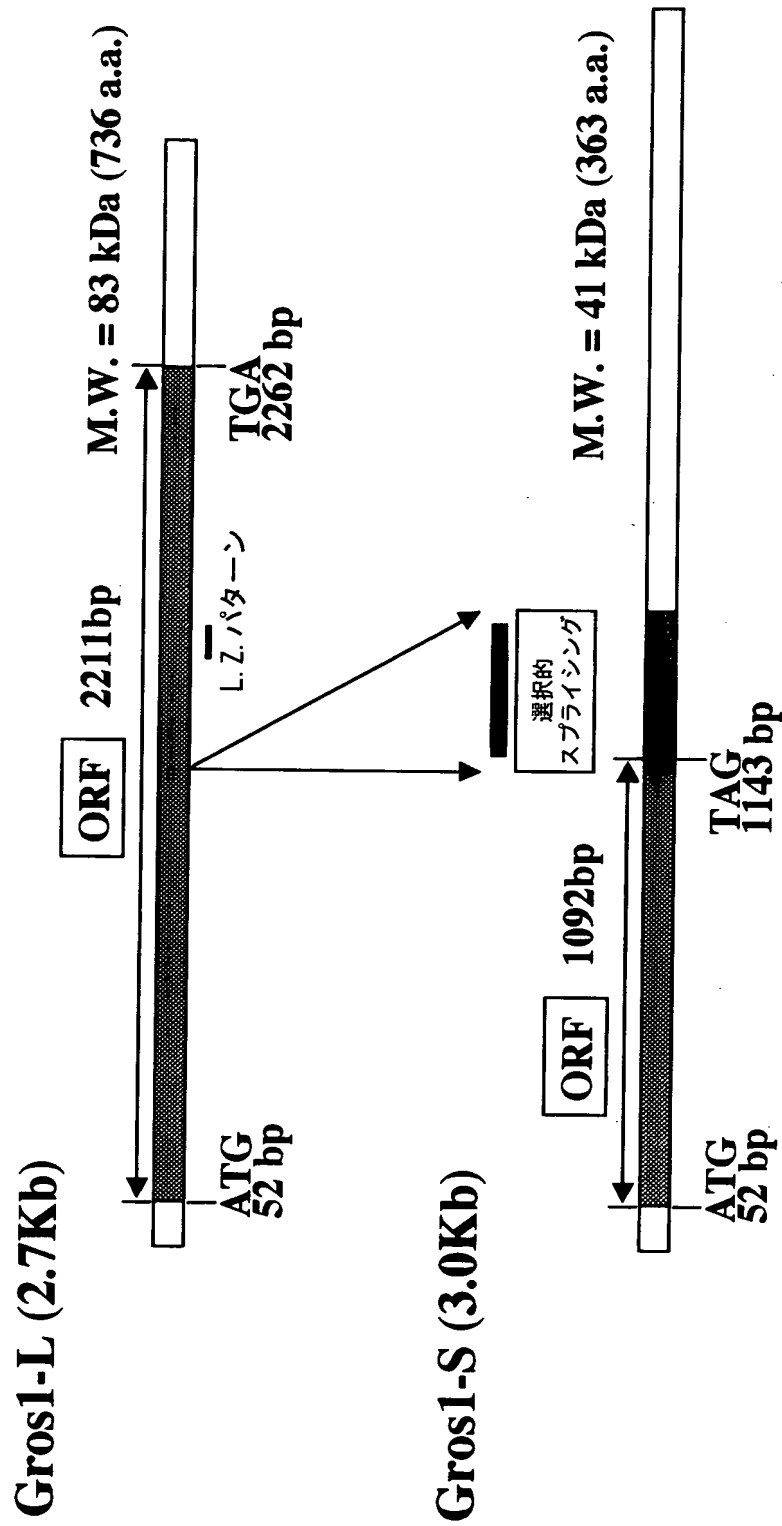
アライメントスコア a:  $\geq 200$ , b: 80-200, c: 50-80, d: 40-50, e:  $< 40$



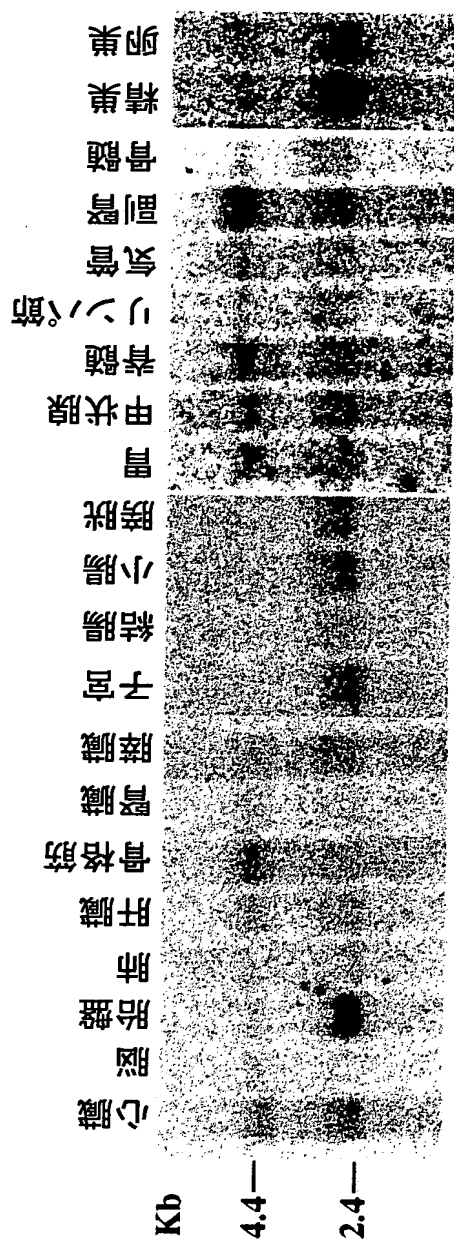
【図 2】



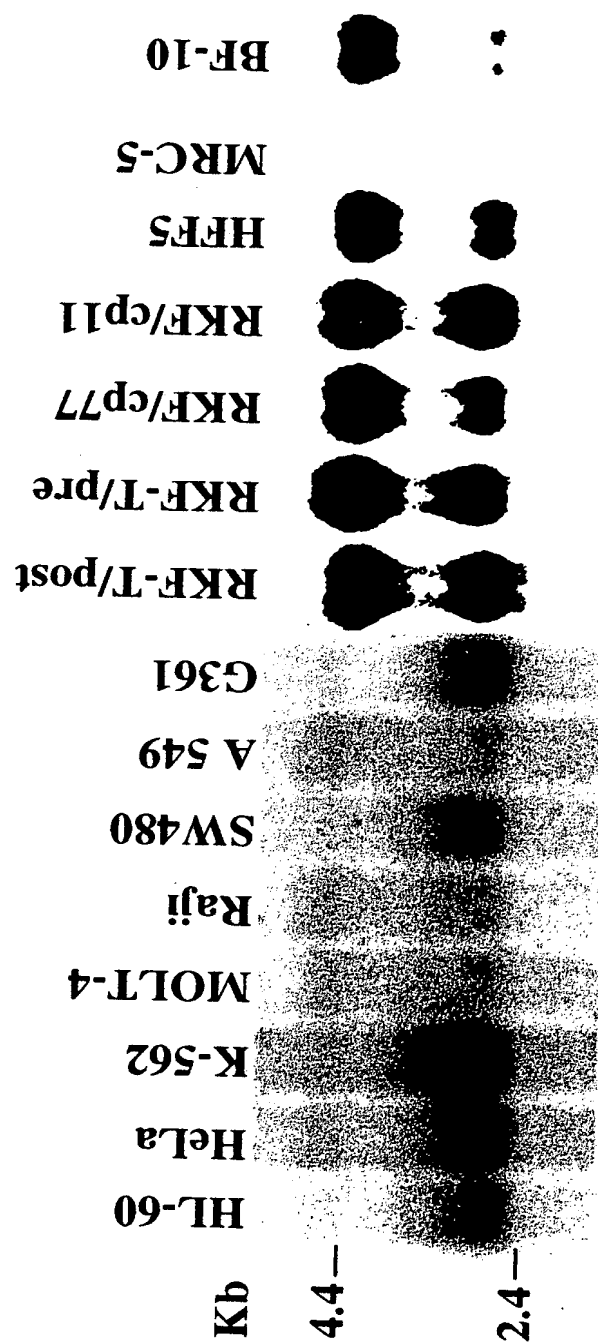
【図 3】



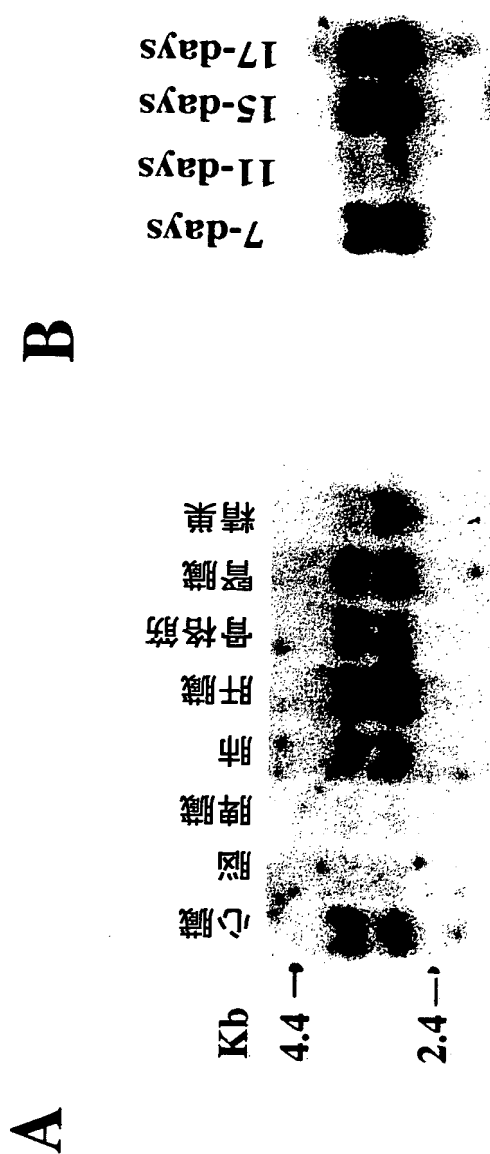
【図 4】



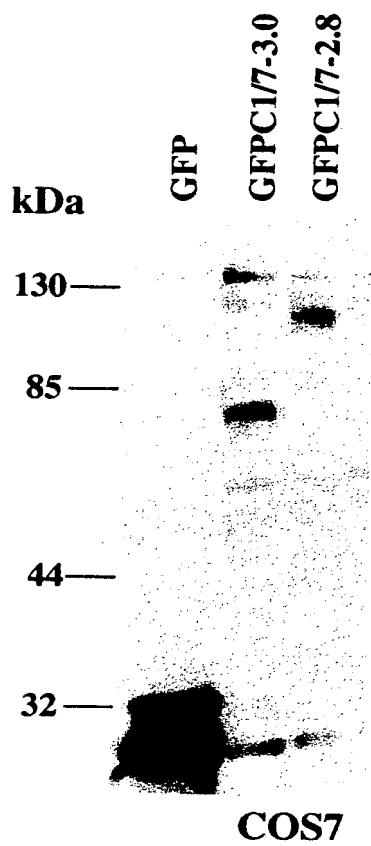
【図 5】



【図 6】



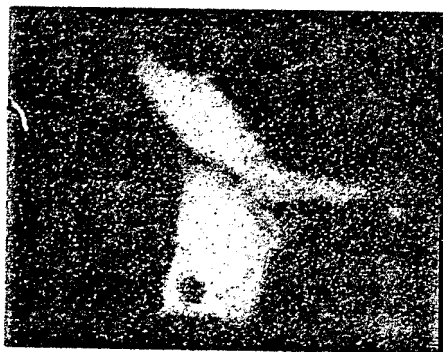
【図 7】



【図 8】

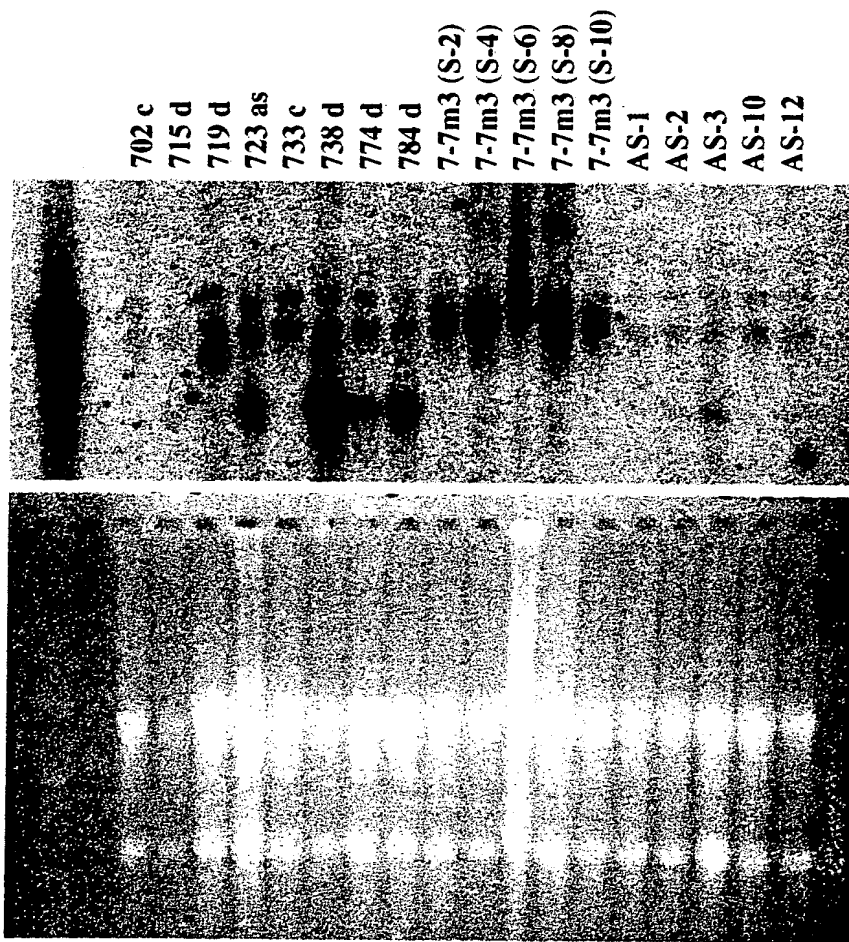


GFPC1/7:2.8kb (83 kDa)

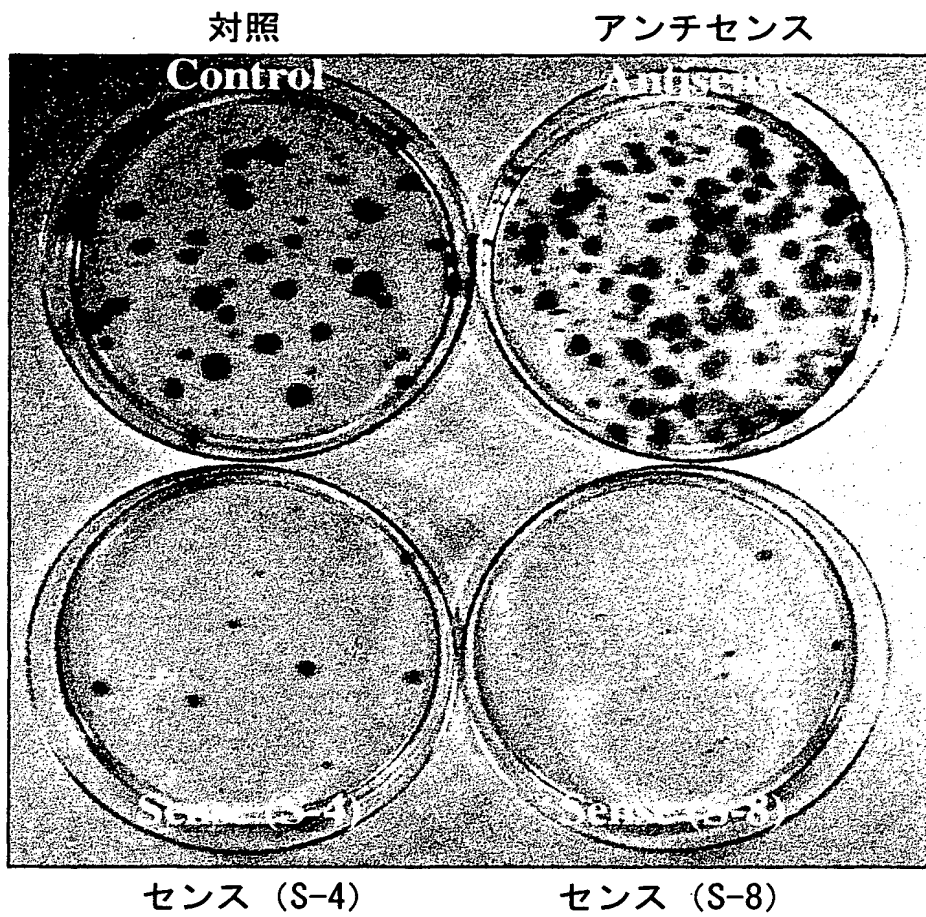


GFPC1/7:3.0 kb (41 kDa)

【図 9】



【図 10】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 細胞増殖の制御に関与する新規なタンパク質およびその遺伝子、並びにそれらの製造および用途を提供することを課題とする。

【解決手段】 ヒト精巣cDNAライブラリーから、細胞増殖の制御に関与する新規なタンパク質（Gros1-LおよびGros1-S）をコードする全長cDNAを単離することに成功した。また、ヒトGros1のマウスホモログ（マウスGros1-LおよびGros1-S）をコードする全長cDNAを単離した。Gros1-Lを外来的に発現する細胞は、コロニー形成率が有意に低下した一方、Gros1アンチセンスRNAを発現する細胞は、コロニー形成率が有意に増加した。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[596102791]

1. 変更年月日 1996年 7月15日

[変更理由] 新規登録

住 所 茨城県新治郡新治村永井153番地2

氏 名 株式会社中外分子医学研究所



Creation date: 10-09-2003  
Indexing Officer: TCOBB - TYLISHA COBB  
Team: OIPEBackFileIndexing  
Dossier: 10045815

Legal Date: 05-02-2002

No.	Docode	Number of pages
1	CRFL	7

Total number of pages: 7

Remarks:

Order of re-scan issued on .....